

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ
ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

На правах рукописи

Хоанг Тхи Нгок Куинь

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИНКСОДЕРЖАЩИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК
ПО ДАННЫМ МОДЕЛИ SPIROTOX**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
к.фарм.н., доцент кафедры
фармацевтической и токсикологической химии
Колдина Алёна Михайловна

Москва - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Цинк - эссенциальный микроэлемент для всех форм жизни: физиологические аспекты	15
1.1.1 Биологическая роль цинка в организме человека	16
1.1.2 Патогенез цинк-дефицитных состояний.....	21
1.1.3 Рекомендуемое потребление цинка	23
1.2 Токсикологический профиль цинка: механизмы и факторы.....	26
1.2.1 Острая и хроническая токсичность цинка и его соединений	26
1.2.2 Факторы, влияющие на токсичность цинкового раствора	30
1.2.3 Взаимодействие цинка с макро- и микроэлементами	36
1.3 Цинксодержащие биологически активные вещества: современные вызовы и стратегии разработки	45
1.3.1 Ограничения в создании биодоступных форм	45
1.3.2 Перспективные направления модификации лигандов	47
1.4 Методы определения цинка и его токсичности.....	49
1.4.1 Рентгенофлуоресцентная спектроскопия (РФС).....	49
1.4.2 Атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС).....	50
1.4.3 Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС)	51
1.4.4 Методы доклинических испытаний токсичности цинка.....	52
ВЫВОДЫ ПО ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ	60
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1 Объекты исследования.....	61
2.1.1 Фармацевтические субстанции	61
2.1.2 Биологически активные добавки и лекарственные средства.....	62
2.1.3 Растворители.....	63
2.1.4 Дополнительные реактивы для исследований	63

2.2 Методы исследования	64
2.2.1 Метод лазерного динамического светорассеяния (DLS, Dynamic Light Scattering)	64
2.2.2 Методы лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS, Low-angle laser light scattering).....	65
2.2.3 Инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК НПВО)	66
2.2.4 Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия	67
2.2.5 Метод оценки биологической активности Spirotox	69
2.2.6 pH-метрия.....	75
2.2.7 Высушивание фармацевтических субстанций	76
2.2.8 Метрологическое обеспечение	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	78
3.1 Исследование химического состава субстанций сульфата цинка методами ИК-НПВО и РФА.....	79
3.1.1 Спектральный анализ кристаллизованного сульфата цинка моно-, гекса-, гептагидрата в ИК-области.....	79
3.1.2 Рентгенофлуоресцентный анализ содержания цинка в фармацевтических субстанциях с использованием референс-образца	80
3.2 Оценка биологической активности цинксодержащих субстанций методом Spirotox и корреляция с LD ₅₀	83
3.3 Изучение влияния фильтрования на энергию активации лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора в растворах сульфата цинка	91
3.4 Измерение дисперсных параметров растворов.....	94
фармацевтических субстанций с помощью методов DLS и LALLS.....	94
3.5 Определение влияния pH на токсичность растворов	100
сульфата цинка моно- и гептагидрата на основе метода Spirotox.....	100
3.6 Применение метода Spirotox для определения биологической активности в двухкомпонентных растворах, содержащих соли цинка и магния	109

3.7 Оценка содержания цинка в БАД и ЛП методом РФА, и их биологическая активность с помощью метода Spirotox	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила цинк в перечень четырёх приоритетных микроэлементов и витаминов, наряду с витамином А, железом и йодом для профилактики недоедания (*WHO Preventing and controlling micronutrient deficiencies in populations affected by an emergency, 2007, Режим доступа: электр. ресурс*). Известно, что цинк может снизить репликацию вируса и повысить иммунный ответ (*Mohammed S. R., 2021*). Благодаря своим нейропротекторным свойствам цинк может быть эффективен не только при симптомах, связанных с COVID-19, но и в терапии воспалительных и нейродегенеративных патологий (*Cereda G. et al., 2022; Kumar A. et al., 2020*). Недостаток цинка наблюдается почти у 30% населения планеты, а в странах с низким уровнем дохода его дефицит занимает пятое место среди ключевых факторов, провоцирующих развитие тяжёлых заболеваний и повышение уровня смертности (*Prasad A.S., 2013*). Во всем мире ежегодно 800 000 детей умирают из-за дефицита цинка (*Deshpande J. et al., 2013*).

Среди переходных металлов цинк занимает второе место по распространённости после железа, играя важную роль в обеспечении нормального функционирования органов (*Alexandre C.B. et al., 2015*). В организме человека цинк присутствует как важный кофактор более чем в 300 ферментах и встречается во всех 7 классах ферментов, включая оксидоредуктазы, помогая стабилизировать их структуру, поддерживать форму и целостность (*Rui H. et al., 2021; Jiahua C. et al., 2023*). В 1985 году термин «цинковые пальцы» появился для обозначения типа белковой структуры, способной связываться с ДНК и основан на исследованиях Аарона Клуга и его коллег (*Aaron K., 2010*). Эта структура содержит ионы цинка и имеет форму пальца, что помогает белку распознавать и связываться с конкретными участками ДНК. Их функции разнообразны в биологических процессах, включая распознавание и

регуляцию экспрессии ДНК, активацию транскрипции (*Laity J. H. et al, 2001*). Около 30–40% внутриклеточного цинка находится в ядре клетки, около половины в цитоплазме и органоидах, а оставшаяся часть связана с клеточной мембраной (*Tapiero H. et al., 2003*).

Цинк не только выступает в качестве катализатора ферментов, но также участвует в защите клеток и регуляции активности генов через транскрипционные факторы (*MacDonald R. S., 2000*). Кроме того, цинк играет ключевую роль в поддержании функций митохондрий, способствуя синтезу АТФ — основного источника энергии, необходимого для всех жизненных процессов клетки (*Hilary Y.L. et. al., 2021*).

Также цинк может способствовать поддержанию барьерной функции мембран, влияя на их проницаемость и стабильность (*Finamore A. et al., 2008*). В настоящее время цинк становится все более заметным благодаря своей роли в лечении рака, так как он является важнейшим компонентом в регуляции клеточного гомеостаза (*Hu H. et al., 2022; Stockwell B.R., 2020; Bonan C. et al., 2024*). Как и другие необходимые для жизни человека микроэлементы, рекомендуемая доза цинка зависит от возраста, пола и состояния здоровья. По данным Национального института здравоохранения (NIH), высокие дозы (токсичная зона) цинка, превышающие 40 мг в день для взрослых, могут быть токсичными (*Schoofs H., 2024*). Дефицит же наблюдается при менее 15 мг в сутки.

Использование биосенсора *Spirostomum ambiguum* для оценки биологической активности водорастворимых лекарственных средств основано на изучении кинетики клеточных переходов при воздействии ксенобиотиков (*Nalecz-Jawecki G., 2004; Goncharuk V.V. et al., 2017; Pleteneva T.V. et al., 2023*). Применение одноклеточного биосенсора согласуется с целями современной фармацевтической науки, которая последние годы ищет этичную и доступную альтернативу экспериментам на животных.

В настоящей работе для прогнозирования биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы, лекарственных средств и биологически активных добавок была использована кинетика лиганд-индуцируемых клеточных переходов *Sp. ambiguum*, позволившая определить наблюдаемую энергию активации ($^{obs}E_a$) медленной стадии процесса гибели клеточного биосенсора. Энергия активации в свою очередь коррелирует со значениями токсичности LD₅₀ для организмов более высокого иерархического уровня, что придает теме исследования еще большую актуальность.

Степень разработанности темы исследования

Учеными кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН был предложен метод использования инфузории *Spirostomum ambiguum* для определения токсичности лекарственных средств на основе аррениусовской кинетики (Сыроешкин А.В. и др., 2001; Быканова С.Н. и др., 2003; Левицкая О.В., Сыроешкин А.В., Плетенева Т.В., 2016; Злацкий И.А., 2016). Также описана связь между наблюдаемой энергией активации ($^{obs}E_a$) гибели клеточного биосенсора и LD₅₀ у животных (Goncharuk V. V. et al., 2017; Pleteneva T.V. et al., 2023). Показано использование метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФС) для определения микроэлементного состава лекарственных средств (Костыгина М.Н. и др., 2017; Макарова М. П. и др., 2019). Биологическая активность хелатных соединений цинка ранее продемонстрирована на примере глицината цинка (Балышев А.В., Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В., 2004; Марухленко А. и др., 2022). В настоящей диссертационной работе предложен подход для сравнения токсичности цинксодержащих фармацевтических субстанций, лекарственных средств и биологически активных добавок. Показана корреляция значений энергии активации гибели клеточного биосенсора и соответствующих LD₅₀ у животных. Установлена зависимость между значениями рН и токсичностью, а также продемонстрировано

изменение биологической активности субстанций цинка при комбинировании с другим металлом.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим направлениям исследования (п. 1 и 3):

Пункт 1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

Пункт 3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Объект исследования

В данной диссертационной работе *объектами* являются цинксодержащие фармацевтические субстанции (ФС), лекарственный препарат (ЛП) и биологически активные добавки (БАД).

Предмет исследования

Предмет диссертационного исследования - поиск физико-химических характеристик химических соединений, влияющих на механизмы биологической активности цинксодержащих субстанций.

Цель работы: Оценка биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы, лекарственных средств и биологически активных добавок на основании модели Spirotox.

Задачи исследования:

1. Разработать методику оценки биологической активности растворов сульфата цинка разной формы обводнения (моно-, гекса- и гептагидрат) с помощью клеточного биосенсора *Sp. ambigua* по данным кинетики гибели.

2. Провести комплексирование результатов, полученных методом Spirotox с результатами валидированных аналитических методов динамического светорассеяния (DLS), лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS), рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) и инфракрасной спектроскопии (ИК-НПВО).

3. Исследовать влияние значения pH среды на биологическую активность соединений, содержащих цинк с помощью метода Spirotox.

4. Сравнить индивидуальную и комбинированную биологическую активность фармацевтических субстанций, содержащих цинк и магний.

5. Исследовать состав и оценить биологическую активность цинксодержащих лекарственных средств (ЛС) и биологически активных добавок (БАД) с использованием *Sp. ambiguum*.

Научная новизна работы. Впервые в мировой практике предложена методика оценки биологической активности цинксодержащих неорганических фармацевтических субстанций, лекарственных препаратов и биологически активных добавок в лабораторных условиях на основе клеточной модели Spirotox. **Впервые** проведено комбинирование результатов физико-химических методов оценки качества с методом биотестирования водорастворимых субстанций цинка сульфата и получена наблюдаемая энергия активации лиганд-индуцируемых клеточных переходов. **Впервые** доказано влияние значения pH среды на токсичность фармацевтических субстанций цинка сульфата с использованием *Spirostomum ambiguum*. **Впервые** методом Spirotox оценена токсичность многокомпонентных растворов, содержащих цинк и магний. **Впервые** проведена оценка биологической активности цинксодержащих ЛС и БАДов на модели *Spirostomum ambiguum*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость научной работы заключается в применении известного ранее метода Spirotox для оценки безопасности фармацевтических субстанций неорганической природы, что является трудоемкой задачей фармацевтической химии. Результаты,

полученные для цинксодержащих веществ, могут быть использованы для прогнозирования биологической активности при создании новых лекарственных препаратов и могут позволить выбрать наиболее безопасную фармацевтическую субстанцию на рынке поставщиков.

Метод определения биологической активности/токсичности растворов водорастворимых ЛС на простейших *Spirostomum ambiguum*, как альтернатива животным, является эффективным подходом, имеющим этическую ценность. Использование метода Spirotox позволяет получить обширную информацию о биологической активности/токсичности фармацевтических субстанций с наименьшими материальными и финансовыми затратами. А также реализуется концепция 3R Уильяма Рассела и Леонарда Берча о гуманном использовании животных в исследованиях, а конкретно отвечает термину «Замена» («Replacement»), означающему замену животной модели на клеточную.

Методология и методы исследования. Методологическую основу диссертационного исследования составили анализ и систематизация данных отечественных и зарубежных литературных источников, посвящённых теме работы (более 250 источников). Метод анализа токсичности для моногидрата и гексагидрата сульфата цинка, включенных в Европейскую фармакопею X (01/2010:2159 и 01/2008:1683), а также гептагидрата сульфата цинка (ФС.2.2.0036.18 ГФ РФ XV) на основе клеточной модели выявил зависимость биологической активности от типа кристаллогидрата, а не от действующего фармацевтического компонента. Подход, описанный в диссертационной работе, логичным образом привел к комплексированию физико-химических и биофармацевтических методов анализа фармацевтических субстанций: инфракрасной спектроскопии, лазерному малоугловому рассеянию света, рентгенофлуоресцентному анализу, динамическому светорассеянию и методу биотестирования Spirotox.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты метода Spirotox на основе кинетики Аррениуса лиганд-рецепторных взаимодействий для сравнения биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы.
2. Зависимость биологической активности от значений pH растворов гидратов сульфата цинка показал важность контроля показателя кислотности для снижения общей токсичности фармацевтических субстанций.
3. Результаты, полученные физико-химическими методами (DLS, LALLS, ИК-спектроскопии, РФА), в комплексе с методом Spirotox для всесторонней оценки качества цинксодержащих лекарственных средств.
4. Экспериментальные результаты, продемонстрировавшие синергический эффект субстанций при совместном применении солей цинка с магнием, на клеточной модели Spirotox для оценки комбинированной токсичности.
5. Результаты применения клеточной модели для определения биологической активности цинксодержащих биологически активных добавок.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность результатов обеспечена сравнением данных, полученных различными инструментальными физико-химическими методами фармацевтического анализа – методом ИК-спектроскопии, динамического лазерного светорассеяния и лазерного малоуглового светорассеяния, рентгено-флуоресцентной спектроскопии, а также методом биотестирования с помощью клеточной модели Spirotox. Статистическая обработка данных осуществлялась с применением программного обеспечения OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США) для визуализации и анализа экспериментальных результатов.

Апробация результатов исследования диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН (протокол № 0300-35-БУП-10 от 10.04.2025).

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: XXVI и XXVII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей "Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье" (Санкт-Петербург, 2023, 2024); IX Международная научно-методическая конференция "Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств" (Воронеж, 2023); 6-я Всероссийская конференция "Физика водных растворов" (Москва, 2023); XIX Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2024); III Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2024).

Публикации по теме исследования

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ: в журналах индексируемых в Scopus – 4, CAS – 2.

Личный вклад автора

В рамках исследования был проведен анализ актуальных научных публикаций по тематике диссертационной работы. Автор самостоятельно проводил экспериментальные исследования и статистическую обработку результатов, а также активно участвовал в интерпретации полученных экспериментальных данных. Кроме того, автор внес личный вклад в исследования, проведенные совместно с коллегами кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН по подготовке научных публикаций на основе выполненной работы.

Структура и объем диссертации

Полный объем диссертации составляет 159 страниц, в том числе 28 рисунков и 10 таблиц. Библиографический список содержит 266 источников. Описание представляемого исследования включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение и список цитируемой литературы.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

Международные базы цитирования Scopus:

1. Tumasov, V. N. Chiral Properties of Zinc Complexes with Bi- and Tridentate Ligands of L- and D-Amino Acids / V.N. Tumasov, A.V. Marukhlenko, A.P. Novikov, **T. N. Q. Hoang**, A.M. Koldina, M.A. Morozova // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2025. – V. 15. – N. 4. – P. 43-52. DOI: 10.7324/JAPS.2025.209656.
2. Uspenskaya, E. V. The development of method for activating pharmaceutical substances with subsequent in situ study of modified powder properties / E. V. Uspenskaya, E. Kuzmina, **T. N. Q. Hoang**, A. A. Timofeev, T. V. Maximova // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2024. – V. 16. – N.5. – P. 194–203. DOI: 10.22159/ijap.2024v16i5.51481.
3. Uspenskaya, E. V. Influence of Mechanical Loading on the Process of Tribochemical Action on Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Substances, Using Lacosamide as an Example: From Micronisation to Mechanical Activation / E. V. Uspenskaya, E. Kuzmina, **T. N. Q. Hoang**, M. A. Komkova, I. V. Kazimova, A. A. Timofeev // Pharmaceutics. – 2024. – V. 16. – N. 6. – P. 798 DOI: 10.3390/pharmaceutics16060798.
4. Sukhanova, V.A. Development of a Comprehensive Approach to Quality Control of Dermorphin Derivative—Representative of Synthetic Opioid Peptides with Non-Narcotic Type of Analgesia / V.A. Sukhanova, E. V. Uspenskaya, S. Ainaz, **T. N. Q. Hoang**, A. A. Timofeev // Scientia Pharmaceutica. – 2025. – V. 93. – N. 1. – P. 3. DOI: 10.3390/scipharm93010003.

Перечень CAS:

5. **Hoang, T. N. Q.** Effect of pH on Toxicity of Zinc Sulphate Hydrate Solutions Using the Spirotox Test / T. N. Q. Hoang, G. V. Petrov, A. M. Koldina, A. V. Syroeshkin // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. – 2024. – V. 14. – N. 6. – P. 31-33. DOI: 10.22270/jddt.v14i6.6597.

6. Kuzmenko, E. E. Determination of the toxicity of zinc sulphate hydrate solution using the Spirotox biotesting method / E. E. Kuzmenko, **T. N. Q. Hoang**, A. M. Koldina, Gleb V. Petrov, Anton V. Syroeshkin // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. – 2025. – V. 15. – N. 3. – P. 89-96. DOI: 10.22270/jddt.v15i3.7047.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Цинк - эссенциальный микроэлемент для всех форм жизни: физиологические аспекты

Цинк (Zn) является важнейшим микроэлементом для жизнедеятельности всех живых организмов на нашей планете. Он играет важную роль во многих биологических процессах, таких как способность влияния на экспрессию генов и белков, катализ ферментативных реакций, обмен веществ, поддержание иммунного ответа, липидный обмен и передачу сигналов [1]. Биологическая роль цинка известна с 1869 года, когда J. Paulin выделил его как важнейший компонент для развития плесневого гриба *Aspergillus niger* [2]. Этот гриб играет сегодня чрезвычайно важную роль в биотехнологической промышленности. Начало XX века ознаменовалось открытием важной роли микроэлементов в развитии животных и растений. В 1934 и 1961 годах, было показано, что цинк является необходимым микроэлементом для развития мышей [3] и человека [4]. Цинк – микроэлемент, занимающий 27-е место в списке самых распространённых элементов в природе, однако он обладает незаменимой ролью в жизнедеятельности.

В данный момент уже более 200 лет с появления первых работ по исследованию цинка в рамках классической медицины XIX века, упоминающих его влияние на лечение эпилепсии в 1786 году [5]. В настоящее время присутствие цинка в биосистемах, от бактерий до высших организмов, подчёркивает важную значимость этого микроэлемента для поддержания жизни во всех видах организмов.

1.1.1 Биологическая роль цинка в организме человека

Данные Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) указывают, что цинк в организме человека присутствует в крайне ограниченных концентрациях (1,5–3 г) [6]. Согласно научным данным, содержание цинка в организме человека варьируется в зависимости от пола: у женщин его количество достигает приблизительно 1,5 г, тогда как у мужчин — 2,5–3 г [7]. Около 60% цинка сосредоточено в скелетной мускулатуре, 30% — в костной системе, а оставшиеся 10% приходятся на кожные покровы, волосы, поджелудочную железу, печень, почки и плазму крови [8].

Мультифункциональность цинка проявляется во всех физиологических процессах, затрагивающих клеточный метаболизм, иммунный ответ и межклеточную коммуникацию. Примечательно, что среди металлов переходной группы цинк занимает второе место в организме по распространенности после железа до меди [9]. В 1939 году было установлено, что цинк выступает обязательным кофактором цинксодержащего фермента карбоангидразы [10]. Карбоангидраза катализирует гидратацию CO_2 в различных единицах организма (в эритроцитах и почках), дегидратацию H_2CO_3 в легких. Эти реакции обеспечивают транспорт CO_2 кровью, а также регулируют концентрацию ионов H^+ и HCO_3^- в биологических жидкостях (кровь, моча, желудочный сок), поддерживая кислотно-щелочной баланс [10].

В 1954 году Б.Л. Валле и Х. Нейрат обнаружили фермент карбоксипептидазы в поджелудочной железе коров, который создает стабильный координационный комплекс с ионом цинка [11]. Данный металлофермент катализирует гидролитическое расщепление пептидных связей исключительно на С-конце полипептидных цепей, обеспечивая ступенчатый протеолиз пищевых белков в двенадцатиперстной кишке [12]. В 1969 году И. Фридович и Д. Маккорд установили, что цинксодержащая супероксиддисмутаза (Cu/Zn-СОД) катализирует дисмутацию супероксидных радикалов в молекулярный кислород и пероксид водорода, предотвращая

оксидативное повреждение клеточных структур [13]. В организме человека цинк выступает незаменимым кофактором для более чем 300 ферментов, помогая стабилизировать их структуру и обеспечивая нормальную функциональность систем, ответственных за протеолиз и метаболизм макронутриентов [14].

Приблизительно треть внутриклеточного цинка сосредоточена в ядерном компартменте, где цинк регулирует транскрипцию генов, взаимодействуя через «цинковые пальцы» — уникальные белковые домены, связывающиеся с ДНК; 50 % сосредоточено в цитоплазме, преимущественно в составе металлотионеинов и активных центров ферментов; оставшиеся 10–20% ассоциированы с клеточной мембраной [15]. Пассивная диффузия цинка через биологические мембраны ограничена из-за образования прочной гидратной оболочки с шестью молекулами воды [16]. Это обуславливает необходимость специализированных транспортёров цинка для поддержания цинкового гомеостаза и регуляции внутриклеточных концентраций. Ионы цинка перемещаются через плазматическую мембрану и внутриклеточные структуры посредством специализированных транспортных систем. К ним относятся белки семейства ZIP (Zrt- и Irt-подобные белки), обеспечивающие импорт цинка в цитоплазму, экспортёры ZnT, регулирующие выведение ионов цинка, а также металлотионеины, синтезируемые в слизистой кишечника, гепатоцитах и почечной ткани для временного хранения и распределения этого микроэлемента [17–19]. Белки ZIP способствуют увеличению концентрации цинка в цитоплазме, поглощая цинк из внеклеточного пространства или выводя его из внутриклеточных органелл. Транспортёры ZnT переносят цинк из клетки или направляют его во внутриклеточные хранилища, тем самым снижая концентрацию цинка в цитоплазме [17, 18, 19]. Металлотионеины (MT) представляют собой низкомолекулярные белки (6–7 кДа), характеризующиеся аномально высокой долей остатков цистеина, которые формируют тиольные кластеры для координации ионов металлов, преимущественно ионов цинка и меди. MT помогают поддерживать баланс необходимых металлов и

выводить избыточные металлы [20]. Координированное взаимодействие транспортёров цинка (ZIP/ZnT) и металлотионеинов помогает контролировать, накапливать и распределять между органеллами и даже эллинировать из организма, что делает цинк малотоксичным для организма [21]. Поэтому причиной заболеваний, связанных с дефицитом цинка у людей, является ослабление активности ZIP, ZnT и МТ [22].

Около 98% внеклеточного цинка в организме человека связано с белками плазмы, включая сывороточный альбумин (60%), α -макроглобулин (30%) и трансферрин (10%) [23]. Альбумин является одним из наиболее важных белков, связывая около 80 % общего количества цинка в плазме крови [24]. Образованные стабильные комплексы альбумина с ионами цинка выполняют функцию биологических переносчиков, транспортируя цинк целенаправленно в клетки различных тканей и органов. Кроме этого, эти комплексы регулируют концентрацию свободного цинка в плазме, поддерживают гомеостаз и оптимизируют биологические процессы, связанные с цинком [25].

Также цинк играет важную роль в поддержании структурной и функциональной целостности митохондрий, опосредуя синтез аденозинтрифосфата (АТФ) — основного источника энергии для клеток [26, 27]. Цинк осуществляет многофункциональную регуляцию как гликолиза, так и цикла трикарбоновых кислот, выступая незаменимым кофактором для ряда ферментов, поддерживая клеточный гомеостаз и защищая митохондрии от окислительного воздействия [17, 28].

Однако, когда концентрация цинка превышает способность гомеостатического контроля и нарушается буферизация клеток, цинк способствует процессу апоптоза (контролируемой гибели клеток) [29]. Причиной этого процесса является нарушение проницаемости мембраны митохондрий, приводящее к высвобождению важного белка в цепи переноса электронов клеточного дыхания — цитохрома С-1, приводящего к апоптозу [30].

В организме человека около 3000 белков, связывающих цинк, причем самым распространенным видом цинк-связывающих белков у человека являются «цинковые пальцы» [31]. Термин «цинковые пальцы», введенный в 1985 году, описывает стабилизированные ионами цинка белковые структуры с характерной «пальцевидной» конформацией, которые специфически связываются с ДНК благодаря взаимодействию определённых аминокислотных остатков [17]. Они участвуют в распознавании специфических участков ДНК, регуляции экспрессии генов и активации транскрипции [17, 32]. Домен этих белков стабилизируется ионом цинка, связанным с цистеиновой и гистидиновой парами.

Последние исследования сосредоточены на роли цинка, как регуляторного элемента и посредника в межклеточной и внутриклеточной передаче сигналов [33, 34]. Поступление цинка в постсинаптические нейроны крайне важно для когнитивной деятельности человека, так как оно тесно связано с глутаматной сигнализацией в синаптической щели. Передача сигналов глутаматергических нейронов и глюкокортикоидных сигналов связана с динамикой иона цинка [35].

Важность цинка подчеркивается тем, что чрезвычайно большое количество заболеваний у человека связано с дефицитом цинка [37, 38]. Цинк обладает противовоспалительным действием и выполняет косвенно антиоксидантную функцию [39]. Цинк является компонентом Cu/Zn СОД, участвующей в системе антиоксидантной защиты организма. Он снижает образование гидроксильных радикалов, ограничивая доступность свободного железа для реакции Фентона [40-42]. Кроме того, цинк связывается с тиоловыми группами (-SH) белков, защищая их от окисления в дисульфидные связи (-S-S-), что способствует сохранению целостности биологических молекул [41, 42].

Цинк рассматривается как вспомогательное средство и дополнительная терапия для неспецифической профилактики и поддержки в лечении инфекций, вызванных коронавирусом, благодаря его противовоспалительным, антиоксидантным,

иммуномодулирующим свойствам, а также его защитной роли в отношении дыхательной системы [43]. Кроме того, цинк играет роль в контроле и регулировании сложных сигнальных путей в иммунных клетках. Цинк оказывает разнообразное влияние на клеточно-специфический эффект клеток иммунной системы, что связано с патогенетическими механизмами заболеваний, связанных с воспалительными процессами. Эти клетки включают тучные клетки [44], тромбоциты [45], макрофаги [46], лимфоциты [47] и т. д.

Концентрация цинка внеклеточного и внутриклеточного может быть определяющим фактором для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы, а прием цинка может предотвратить сердечную недостаточность [48]. Ионы цинка необходимы для стабилизации гексамерной формы инсулина, а изменение его содержания в поджелудочной железе ассоциировано с развитием сахарного диабета 2-го типа и другими формами диабета, связанными с дисфункцией β -клеток [49-51]. Дисбаланс цинка формирует патогенетическую связь между диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Цинк привлекает всё больше внимания в онкологии благодаря своей роли в регуляции клеточного гомеостаза, включая контроль апоптоза, репарацию ДНК и подавление ангиогенеза [52-54]. Клинические исследования последних лет выявили корреляцию между гипоцинкемией и риском развития ряда злокачественных опухолей, таких как рак предстательной железы [55]. Предстательная железа выполняет функцию аккумуляции цинка и синтеза цитрата, тогда как рак предстательной железы и злокачественные опухоли связаны со снижением уровня цинка и дефицитом транспортера ZIP1 [56, 57].

Клинические данные свидетельствуют, что дефицит цинка усиливает взаимодействие между шиповидным белком SARS-CoV-2 и ангиотензин-превращающим ферментом 2, повышая риск инфицирования [58]. Таким образом, регулирование метаболизма цинка способно модулировать иммунный ответ, подавляя

гиперактивацию провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α) и предотвращая развитие цитокинового шторма у пациентов с COVID-19. Это подтверждается метаанализом исследований, где добавление цинка к терапии тяжёлой пневмонии достоверно снижало симптомы воспаления [59].

Однако избыток цинка может вызывать неврологические патологии [60]. В то время как дефицит цинка может вызвать нейропсихиатрические расстройства [61]. Таким образом, физиологическое или фармакологическое действие цинка полностью зависит от его избытка или дефицита. Этот сложный баланс наблюдается в относительно узком диапазоне концентраций и требует строгого контроля при рассмотрении добавления цинка при лечении заболеваний у пациентов [62].

1.1.2 Патогенез цинк-дефицитных состояний

Во всем мире около двух миллиардов человек страдают от дефицита цинка, что приводит к серьезным последствиям для нормального функционирования органов в организме человека и работы иммунной системы [37, 63].

В западных странах почти 30 % пожилых людей страдают от дефицита цинка [37, 64]. Считается, что дефицит цинка тесно связан с экономической ситуацией в регионе, что отражает взаимосвязь между дефицитом цинка и рационом питания. В странах с низким и средним уровнем дохода дефицит цинка наблюдается у 20% населения [65]. Люди, придерживающиеся вегетарианской или веганской диеты, также подвержены риску дефицита цинка [66]. Эпидемиологические данные указывают на критическую ситуацию в странах Латинской Америки и Карибского региона, где, согласно отчётам, распространённость дефицита цинка достигает 44% [67].

В Российской Федерации демографические исследования выявили региональные различия: от 18 % до 46 % населения имеют критически малый уровень

потребления цинка, в том числе дефицит потребления цинка с питанием у детей составляет около 50–70 % [68]. Одновременно, даже среди здоровых людей (женщин репродуктивного возраста) только в 5% случаев организм получает достаточное количество всех необходимых витаминов и микроэлементов. В частности, дефицит цинка наблюдается у 65–70% здоровых мужчин и женщин моложе 40 лет в странах Западной Европы и у 78–82% россиян [69].

В настоящее время установлено, что основной причиной дефицита цинка являются недостаточное питание, неполноценный рацион, низкий уровень всасывания и патологии, вызывающие потерю цинка [70]. Некоторые лекарственные препараты, такие как, этамбутол, противосудорожные препараты, пеницилламин, железосодержащие препараты, слабительные и антациды, также известны как способствующие дефициту цинка [70-72]. Беременные женщины, пожилые люди, дети и младенцы, а также люди, соблюдающие диету, также подвержены риску дефицита цинка. Танины, содержащиеся в кофе, также могут препятствовать усвоению цинка [73].

Дефицит цинка может быть первичным или вторичным. Первичный дефицит цинка возникает из-за прямых причин, связанных с питанием, или генетических мутаций, которые влияют на усвоение цинка. Например, энтеропатический акродерматит — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее вследствие мутации гена SLC39A4, который кодирует цинк-транспортирующий белок ZIP4 [71]. Различные заболевания, такие как диабет, цирроз печени могут быть причинами вторичного дефицита цинка. Дефицит цинка может быть связан с некоторыми заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [74-76].

Дефицит цинка во время беременности может привести к серьезным последствиям для новорожденных, включая дисфункцию кишечника и ослабление иммунной системы [77, 78]. Кроме того, дефицит цинка может оказывать негативное

влияние на развитии мозга, приводя к когнитивным нарушениям, ухудшению памяти и ограничению способности к обучению у детей в будущем [79, 80].

Согласно статистике, во всем мире ежегодно 800000 детей умирают из-за дефицита цинка [73] и причинами смертности являются заболевания, связанные с диареей и инфекциями дыхательных путей, которые приводят к значительной потере цинка и увеличивают потребность организма в цинке для восстановления и поддержания иммунной функции [74]. Таким образом, добавление цинка чрезвычайно важно для поддержания здорового организма, укрепления иммунной системы и эффективной профилактики заболеваний.

1.1.3 Рекомендуемое потребление цинка

Рекомендуемые суточные нормы потребления цинка варьируются в зависимости от индивидуальных физиологических характеристик (возраст, пол, масса тела) и уровня фитатов в пищевом рационе (Таблица 1).

Таблица 1. Рекомендуемая суточная норма цинка (мг в день) по WHO в зависимости от биодоступности цинка [86]

a - для младенцев, вскармливаемых грудным молоком; *b* - для младенцев, вскармливаемых искусственными смесями; * - низкая доступность соответствует молярному соотношению фитат/цинк более 15, умеренная доступность соответствует соотношению от 5 до 15, а высокая доступность соответствует соотношению фитат/цинк меньше 5.

Возврат	Низкая биодоступность*	Умеренная биодоступность*	Высокая биодоступность*
0–6 мес	6,6 ^b	2,8 ^b	1,1 ^a
7–12 мес	8,4	4,1	0,8 ^a /2,5
1–3 года	8,3	4,1	2,4
4–6 лет	9,6	4,8	2,9

Продолжение таблицы 1.

Возврат	Низкая биодоступность*	Умеренная биодоступность*	Высокая биодоступность*
7–9 лет	11,2	5,6	3,3
10–18 лет, мужской	17,1	8,6	5,1
10–18 лет, женский	14,4	7,2	4,3
Мужской, 19+	14,0	7,0	4,2
Женский, 19+	9,8	4,9	3,0

Международные рекомендации по нормам потребления цинка имеют региональные различия. Национальный институт здоровья США (NIH, 2022) устанавливает норму в 11 мг/сутки для взрослых мужчин и 8 мг/сутки для женщин, увеличивая её до 11–12 мг/сутки в период беременности и лактации [81].

Немецкое общество питания адаптирует показатели под содержание фитатов, рекомендуя мужчинам 11–16 мг/сутки, а женщинам — 7–10 мг/сутки в зависимости от состава рациона [82]. Для беременных и кормящих женщин рекомендуемое количество цинка может достигать 13–14 мг/день. Для младенцев и детей рекомендуемая суточная норма потребления составляет 2,5 мг/день [82].

Европейское управление по безопасности продуктов питания (EFSA) рекомендует нормы потребления цинка для населения в диапазоне от 9,4 до 16,3 мг/день для мужчин и от 7,5 до 12,7 мг/день для женщин [83]. В связи со способностью фитата препятствовать усвоению цинка, Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов и Немецкое общество питания выпустили справочные рекомендации по необходимому количеству цинка на основе уровня потребления фитатов. В частности, скорректированные рекомендации соответствуют потреблению фитатов приблизительно 300–330 мг/день, 600–660 мг/день, 900–990 мг/день и 1200 мг/день [83, 86].

Согласно рекомендациям Французского агентства по продовольствию, окружающей среде, гигиене труда и технике безопасности (ANSES), суточная потребность в цинке для мужчин варьируется в пределах 9,4–14 мг, а для женщин — 7,5–11 мг, что коррелирует с уровнем потребления фитатов [84].

В то время как Японское Министерство здравоохранения, труда и социального обеспечения устанавливает фиксированные нормы: 10 мг/сутки для мужского населения и 8 мг/сутки — для женского [85]. При этом важно учитывать, что верхний безопасный предел потребления цинка для взрослых составляет 40 мг/сутки, превышение которого может привести к негативным последствиям для здоровья.

Цинк в основном усваивается в кишечнике, особенно в двенадцатиперстной и тощей кишке, где всасывание питательных веществ происходит наиболее эффективно [87, 88]. На апикальной и базолатеральной мембранах клеток тонкого кишечника находятся переносчики цинка и МТ, которые играют важную роль в регуляции и поддержании баланса концентрации цинка в кишечнике, а также во всем организме [89, 90].

Биодоступность цинка напрямую коррелирует с его химической формой. Наибольшей биодоступностью обладают органические соединения цинка с аминокислотами (аспартат, цистеин, гистидин) [91, 92]. Следующую позицию в рейтинге биодоступности занимают неорганические соли — хлоридные, сульфатные и ацетатные комплексы. Наименее биодоступной формой считается оксид цинка, что ограничивает его применение [91, 92].

Рекомендуемая дозировка цинка также варьируется в зависимости от клинической ситуации. Например, пациентам с воспалительными заболеваниями респираторного тракта или острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ) показано применение леденцов, содержащих сульфат или глюконат цинка, в суточной дозе до 75 мг [93-96]. Людям, которым приходится принимать антибиотики широкого

спектра действия, прием цинка в дозе 20 мг/день может помочь ускорить процесс выздоровления и снизить риск развития лекарственной устойчивости [97].

Назначение цинксодержащих лекарственных препаратов становится все более широко применяемым в профилактике и лечении таких заболеваний, как диарея и пневмония [98]. Прием цинка не только способствует снижению заболеваемости, но также связан со снижением уровня смертности. Подсчитано, что добавление цинка к рациону может предотвратить сотни тысяч детских смертей каждый год [99].

Наиболее эффективным методом устранения дефицита цинка считается оптимизация пищевого рациона за счет включения продуктов с высоким содержанием этого микроэлемента. К биодоступным животным источникам относятся красное мясо (особенно говядина), субпродукты (печень) и морепродукты (устрицы, крабы). Среди растительных источников лидируют цельнозерновые крупы (овёс, киноа), грибы шиитаке, бразильские орехи и бобовые (нут, чечевица). Молочные продукты (твёрдые сыры) и обогащённые злаковые смеси дополняют перечень стратегических пищевых групп для профилактики дефицита цинка [100].

1.2 Токсикологический профиль цинка: механизмы и факторы

1.2.1 Острая и хроническая токсичность цинка и его соединений

Цинк, хотя и является необходимым микроэлементом для здоровья, может быть вредным при чрезмерном употреблении (высшее 40 мг/день) или при нарушении гомеостаза из-за ингибирующего воздействия ионов других металлов, таких как медь и железо [101, 102]. Токсичность цинка может варьироваться в зависимости от лекарственной формы его изготовления и способа взаимодействия с организмом. Цинк считается относительно нетоксичным, особенно при пероральном приёме. Симптомы

отравления цинком возникают только тогда, когда в организм поступает чрезвычайно большое количество цинка [61].

Различные формы цинка, такие как неорганические соли цинка и органические, имеют разную биодоступность. Факторы, такие как растворимость цинка, способность к абсорбции в кишечнике и уровень pH, также значительно влияют на состояние дефицита или избытка цинка, вызывающего токсичность. Факторы, вызывающие отравление цинком, включают чрезмерное употребление цинковых добавок сверх рекомендованных норм [62], а также лиц, страдающих болезнью Вильсона — редким аутосомно-рецессивным генетическим заболеванием, характеризующимся накоплением меди в организме. У таких людей повышен риск отравления цинком, поскольку цинковые добавки часто используются в качестве метода лечения для контроля уровня меди в организме [103]. Кроме того, работники, занятые в таких областях, как сварка, добыча цинка и металлургия, чаще подвержены вдыханию цинковой пыли или частиц металла через дыхательные пути, что создаёт потенциальный риск серьёзного отравления [104, 105].

Острая токсичность цинка — это редкое явление, которое происходит только при попадании в организм чрезвычайно высоких доз этого элемента. В отличие от более токсичных металлов IIb группы, таких как кадмий (нефротоксическое действие) и ртуть (нейротоксичность), цинк обладает сравнительно низкой опасностью для здоровья [106]. Острая токсическая доза составляет 325–650 мг элементарного цинка, что эквивалентно одномоментному приёму 22–43 стандартных таблетированных форм цинксодержащих лекарственных препаратов [107].

Однако прием цинка в дозах 50 мг и выше в течение нескольких недель может препятствовать усвоению меди, тем самым ослабляя иммунную функцию [61, 106, 108]. Предыдущие исследования показали, что воздействие цинка в концентрациях от 300 мкМ до 600 мкМ в течение всего 15 минут может вызвать массовую гибель нейронов в культурах тканей клеток коры головного мозга [109]. Симптомы

отравления цинком включают тошноту, головокружение, головную боль, боль в желудке, рвоту, потерю аппетита, боль в эпигастральной области, вялость и усталость [73, 81]. Поэтому дефицит или избыток цинка представляет собой серьезную клиническую проблему [106].

Работники металлургической промышленности подвергаются риску вдыхания паров цинка, что может привести к развитию «литевой лихорадки» (металлической лихорадки). Это острое состояние, вызываемое вдыханием оксида цинка (ZnO) в концентрации 1–34 мг/м³, которое обычно длится около 24–48 часов, клинические проявления включают озноб, лихорадку, потливость, слабость, кашель, мышечные боли, боль в груди и затрудненное дыхание. Исследование Фредериксона и его коллег подтвердило, что на клеточном уровне превышение концентрации цинка свыше 300 мкМ может привести к нейротоксичности [110].

Хроническая токсичность цинка развивается при длительном воздействии высоких доз от 150 до 450 мг в сутки, что эквивалентно потреблению элементарного цинка в указанном диапазоне [111]. Признаки хронического отравления цинком включают вялость, тяжелую анемию, снижение иммунитета, ожирение и заболевания, связанные с пониженным уровнем липопротеинов [71].

Было доказано, что цинк играет роль в процессе деполяризации мембраны после острой черепно-мозговой травмы [112]. Эта деполяризация мембраны приводит к усилению нейротоксического действия цинка [113]. Другие исследования показали, что цинк в организме может действовать как быстрый и мощный нейротоксин, а также как токсин для глиальных клеток [114, 115].

Кроме этого, цинк описывается как необходимый компонент каскада реакций после судорог, ишемии (недостаточного кровоснабжения органа, особенно сердечной мышцы) и черепно-мозговой травмы [116]. Тем не менее, отравление цинком у людей встречается редко и не является распространенным [117].

Хроническая токсичность цинка обычно наблюдается у пациентов, длительно принимающих цинк в дозах, превышающих рекомендуемые, для лечения заболеваний (Таблица 2).

Таблица 2. Симптомы хронической токсичности цинка в зависимости от дозировки

Дозировка	Период	Типичные симптомы
40–100 мг/день	> 3 месяцев	Тошнота, желудочно-кишечные расстройства, снижение уровня холестерина ЛПВП.
100–300 мг/день	> 1 месяца	Дефицит меди (анемия, утомляемость), иммунодефицит.
> 300 мг/день	Несколько недель	Острое повреждение почек, тяжелые неврологические расстройства.

Согласно данным Грея Дж. Фосмайра, длительный приём высоких доз цинка (100–300 мг/день) для лечения заболеваний или самостоятельного приёма через безрецептурные биодобавки (15–100 мг/день) повышает риск хронического отравления цинком, проявляющегося нарушениями обмена меди и иммунодефицитом [61]. Также, как альтернатива вакцине против COVID-19, использование цинка в форме глюконата цинка в дозировке 65 мг/сутки считается эффективным [118]. Установлено, что превышение рекомендуемых доз цинка может оказывать терапевтический эффект при некоторых заболеваниях, однако длительное применение высоких доз приводит к риску хронической интоксикации цинком.

1.2.2 Факторы, влияющие на токсичность цинкового раствора

На формирование токсического эффекта влияют физико-химические свойства токсиканта (размер частиц дисперсной фазы, стереохимия активных центров и др.) и биологической среды. Особенно важно учитывать наличие синергистов или антагонистов, способных усиливать или подавлять токсический эффект [119].

Цинк является двухвалентным элементом с ионным радиусом около 0,74 Å. Атом цинка способен образовывать координационные соединения с азотом, кислородом, серой и галогенами. Цинк, обладающий стабильной d^{10} - электронной конфигурацией $[Ar]3d^{10}4s^2$, проявляет уникальную химическую инертность в окислительно-восстановительных процессах, что принципиально отличает его от переходных металлов с незаполненными d -орбиталями (Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^{+}/Cu^{2+}) [120]. Однако ионы цинка (Zn^{2+}) проявляют свойства электрофилов, образуя координационные связи за счет присоединения неподеленных электронных пар. В биологических системах цинк демонстрирует амфотерность. В зависимости от значения pH среды цинк формирует гидратированные комплексы (с H_2O) или переходит в гидроксоформы с OH^- [121]. В свою очередь благодаря водородным связям молекулы воды имеют тенденцию группироваться в более крупные и сложные кластеры с общей формулой $(H_2O)_n$, размеры которой варьируются от нано- до микрометров [122, 123].

Вследствие обмена энергией, теплом и массой воды с окружающей средой водородные связи между молекулами воды легко разрушаются и восстанавливаются. Вода определяется как лиганд с промежуточными свойствами между жесткими и мягкими лигандами благодаря регуляторному механизму, основанному на динамическом балансе между «жестким» компонентом — электростатическими силами (ионно-дипольными взаимодействиями) и «мягким» компонентом — взаимодействиями с переносом заряда [16, 124].

Координационное число и геометрия комплексов цинка в растворе в основном определяются радиусами как металлического иона, так и атомов или ионов лиганда. Ионы цинка способны образовывать комплексы с координационными числами от 1 до 7, среди которых преобладают тетраэдрическая ($n=4$) и октаэдрическая ($n=6$) формы. Это структурное разнообразие отражает гибкость d^{10} -электронной конфигурации ионов цинка [125-127]. Отаки и его коллеги установили, что ионы цинка в водном растворе образуют первый гидратный слой из шести молекул воды [128] (Рисунок 1).

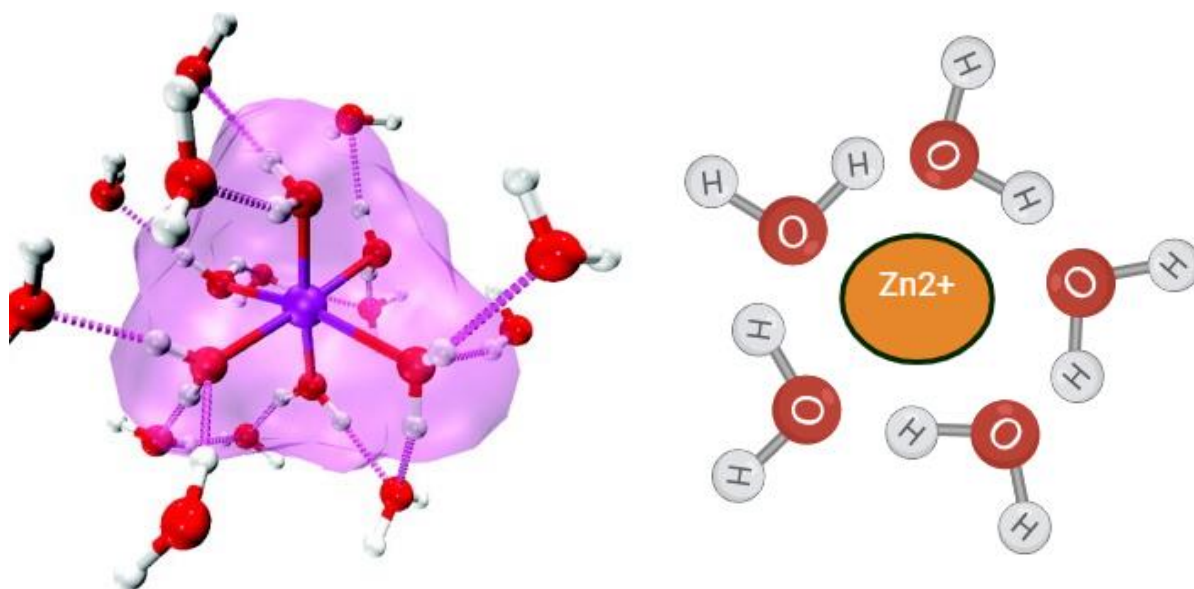


Рисунок 1. Кластеры цинка в водном растворе

Молекула воды взаимодействует с ионом Zn^{2+} через электростатическое ион-дипольное притяжение: неподелённые электронные пары на О смещаются в сторону Zn^{2+} , образуя первый гидратный слой с устойчивой ориентацией. Это взаимодействие усиливает полярность связи О–Н, одновременно увеличивая дипольный момент воды. Второй гидратный слой формируется опосредованно через водородные связи между H^+ (первый слой) и О (второй слой), поддерживая слоистую гидратную структуру. Данный механизм объясняет электропроводность раствора (благодаря

упорядоченному движению гидратных слоёв) и стабилизацию физико-химических свойств системы.

Позже Наталия Диас и её коллеги опубликовали исследование, подтверждающее, что цинк в шестикоординационной форме обладает большей стабильностью по сравнению с четырёхкоординационной [16]. Несмотря на многочисленные предыдущие работы, посвящённые кластерам $Zn^{2+}(H_2O)_n$ глобальные минимумы энергии и координационные числа для $n \geq 6$ остаются сомнительными. Последние исследования указывают, что координационное число n может достигать 12, что свидетельствует о высокой гибкости цинка и его способности формировать кластеры различных размеров в растворе [129, 130].

Цинк является важнейшим микроэлементом, участвующим во многих биологических процессах благодаря своей способности гибко связываться с молекулами воды и органическими соединениями. В зависимости от условий pH, концентрации ионов и наличия других лигандов цинк может образовывать различные кластеры. Это разнообразие определяет биологическую активность цинка, которая, в свою очередь, регулирует синтез белка, стабилизацию структуры ферментов, а также образование и восстановление нуклеиновых кислот [131].

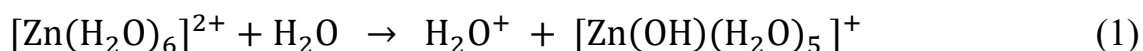
Значение pH раствора цинка зависит от типа связанного с ним аниона и концентрации раствора. Согласно ГРФ 15 ФС.2.2.0036.18 значение pH 5% раствора цинка сульфата гептагидрата находится в пределах от 4,4 до 5,6. Согласно Европейской фармакопее (Ph. Eur.) 11-го издания, 5% раствор моногидрата и гептагидрата сульфата цинка в дистиллированной воде также имеет pH от 4,4 до 5,6. В водном растворе появляется осаждение гидроксида цинка при концентрации 1 моль/л при pH 5,4 [132]. (Таблица 3).

Таблица 3. Значение рН осаждения гидроксидов цинка [132]

Гидроксид	Значение рН				
	Исходная концентрация иона, инициирующая осаждение		Условие полного осаждения (концентрация остаточных ионов $<10^{-5}$ М)	Точка начала растворения (переход к неполному осаждению)	Полное растворение сформированного осадка
	1 М	0,01 М			
Zn(OH)_2	5,4	6,4	8,0	10,5	12-13

Цинк может взаимодействовать с малыми молекулами, образуя комплексы с координационными числами равными 4, 5 и 6 [16, 121]. В водном растворе ион цинка в основном существует в виде гекса-аквакомплекса $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ [133], особенно в кислой среде. Эти комплексы часто упрощенно обозначаются как Zn(OH)^+ , $\text{Zn(OH)}_{2(\text{pp})}$, Zn(OH)_3^- и Zn(OH)_4^{2-} , что является упрощением, сосредоточенным на количестве лигандов.

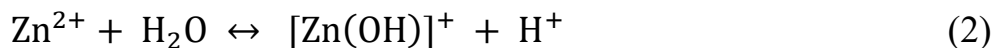
Ион цинка в водном растворе обладает слабокислой природой, поскольку $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ участвует в реакции гидролиза, с рКа около 9 [134].



По уравнению Хендерсона–Хассельбаха $\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$ было установлено, что чем выше концентрация соли цинка, тем ниже значение рН. В случаях, когда лигандами цинка являются анионы сильных кислот, они действуют как чрезвычайно слабые основания и не оказывают существенного влияния на рН водных растворов.

Анион сульфат SO_4^{2-} — один из неорганических анионов, обладающий самой сильной связывающей способностью по отношению к цинку.

Исследования Choi и его коллег подробно описали формы существования ионов цинка в водном растворе, зависящие от лигандов и уровня pH [135]. Свободный ион цинка преимущественно существует в диапазоне pH от 4 до 8,5. В кислой среде равновесие смещается влево согласно реакции:



Согласно теории Брэнстеда–Лоури, комплексы цинка в воде обладают кислотными свойствами, поэтому при снижении pH цинк преимущественно существует в форме иона Zn^{2+} .

При нейтральных и слабощелочных значениях pH ион цинка начинает образовывать комплексы с OH^- , формируя такие формы, как $[\text{Zn}(\text{OH})]^+$ или $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$. $[\text{Zn}(\text{OH})]^+$ существует только до максимального pH 8,5. Форма $[\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{pp})]$ преимущественно распределяется в диапазоне pH от 9,0 до 11,0. При дальнейшем увеличении pH образуются тригидроксикомплексы $[\text{Zn}(\text{OH})_3]^-$ и тетрагидроксикомплексы $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$, которые преобладают при pH больше 11,5.

При pH 8,0 формы цинка в растворе включают $\text{Zn}^{2+}(\text{pp})$ и превращаются в комплексы, такие как аквамоногидрокси $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})^+]$, акводигидрокси $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]$, акво-тригидрокси $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3^-]$ и акво-тетрагидрокси $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^{2-}]$. Это также наглядно иллюстрируется на диаграмме распределения форм существования цинка по Пурбе в воде [42]. Видно, что свободные ионы цинка составляют большую часть при pH меньше 4 постепенно уменьшаются от pH 5 до 8. В слабощелочной среде pH от 8 – 10,5 появляются $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnO и при pH больше 11 появляются ионы $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$. Очевидно, что по мере постепенного повышения pH до нейтрального количество свободных ионов цинка постепенно уменьшается [136] (Рисунок 2).

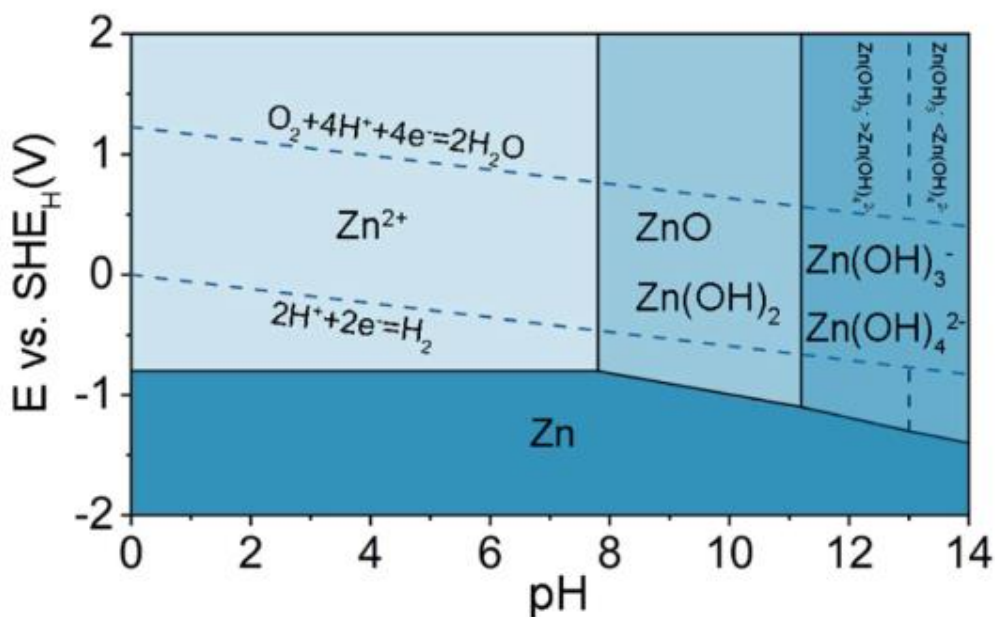


Рисунок 2. Распределение соединений Zn(II) в водном растворе в зависимости от pH, по [136]

Разнообразие существования ионов цинка в растворе при различных значениях pH влияет на биологическую роль цинка из-за различий в значениях pH в различных органах организма, и даже в разных клеточных компонентах [137]. Увеличение значения pH вызывает депротонирование, в то время как снижение pH оказывает противоположный эффект. Кисотно-основные свойства лиганда изменяются в зависимости от комплекса: сильные связи существенно изменяют рКа, тогда как более слабые связи оказывают меньшее влияние на значение рКа.

Токсические свойства цинка во многом зависят от физических и химических свойств растворителя - воды. Основными факторами, влияющими на токсичность, являются жесткость воды и pH. Снижение жесткости и повышение pH увеличивают токсичность растворимого цинка [138-140]. Примечательно, что можно предположить, что некоторые метаболические каналы активны лишь в определенных диапазонах pH. Это приводит к интересному следствию: метаболит, необходимый для роста при одном определенном значении pH, может не потребоваться при другом [141].

Несколько исследований показали, что значение pH связан с токсичностью цинка на поверхности водорослей, причем токсичность цинка пропорциональна концентрации цинка, связанного с поверхностью, что указывает на то, что клеточная поверхность водорослей является биологическим лигандом. Уайлд и др. сообщили, что Cu и Zn токсичны для *Chlorella sp.*, особенно при повышении pH с 5,5 до 8,0. Они также указали, что ионы H^+ при низком pH оказывают защитное действие, уменьшая конкуренцию ионов металлов на поверхности [142]. Значение pH воды является важным фактором, влияющим на токсичность металлов для пресноводных микроводорослей, хотя связь между pH и токсичностью в значительной степени зависит от вида водорослей.

Некоторые исследования показали, что токсичность металлов увеличивается при снижении pH, поскольку свободные ионы металлов преобладают при низком pH [143] аналогично тому, как это происходит у рыб и беспозвоночных. Напротив, большинство других исследований с микроводорослями (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* и *Pseudokirchneriella sp.*) показали увеличение токсичности металлов при повышении pH из-за снижения конкуренции между ионами металлов и H^+ на поверхности клеток [144, 145].

1.2.3 Взаимодействие цинка с макро- и микроэлементами

Взаимодействие между цинком и другими металлами обусловлено схожими химическими свойствами ионов цинка и других двухвалентных катионов (независимо от их принадлежности к необходимым или токсичным элементам) [146]. Хилл и Матроне в 1970 году подтвердили принцип химического сходства, согласно которому металлы с близкими ионными радиусами и зарядами конкурируют в биологических процессах [147]. Взаимодействия между необходимыми металлами в организме всё больше привлекают внимание научного сообщества. Понимание этих механизмов не

только позволяет оптимизировать усвоение микроэлементов, но и служит ключом к расшифровке механизмов токсичности тяжёлых металлов и разработке эффективных методов детоксикации. Металлы, конкурирующие с цинком или действующие синергично с ним, представлены ниже.

Взаимодействие с железом

Железо является основным компонентом гемоглобина, который играет ключевую роль в транспорте кислорода в крови, а также миоглобина, который помогает запасать кислород в мышцах [148]. Железо участвует в электрон-транспортной цепи митохондрий, играя важную роль в производстве энергии (АТФ) и формировании множества ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах [149].

Цинк и железо могут взаимодействовать на различных уровнях, включая всасывание, транспорт, хранение и взаимодействие с ферментами. Цинк и железо конкурируют за всасывание в тонком кишечнике, поскольку оба иона Zn^{2+} и Fe^{2+} используют общий транспортный канал DMT1 (Divalent Metal Transporter 1, Транспортёр двухвалентных металлов 1). Палса Кондайя и его коллеги также показали, что цинк, по-видимому, является регулятором уровней DMT1 и Ферропортин-1 — ключевых модуляторов всасывания железа в кишечнике и распределения его в тканях [150].

Таким образом, избыточное поступление железа в организм подавляет усвоение цинка [151, 152] и наоборот, избыток цинка подавляет усвоение железа [153]. Несколько клинических исследований на людях показали низкие концентрации цинка в сыворотке у людей с анемией, и, кроме того, концентрации цинка в сыворотке значительно коррелируют с гемоглобином [154]. Исследования на экспериментальных животных показали, что развитие железодефицитной анемии и накопление железа в

тканях также происходят одновременно при дефиците цинка [155, 156]. Это особенно важно, поскольку дисбаланс между этими двумя элементами может привести к дефициту микроэлементов. И цинк, и железо связываются с транспортными белками в крови и конкурируют за связывание, поскольку железо и цинк имеют схожие физико-химические свойства. Установлено, что железо является окислителем, а цинк считается антиоксидантом [157]. Поэтому необходимо контролировать количество избыточного железа, поступающего в организм, чтобы поддерживать сбалансированное окислительно-восстановительное состояние. Как можно видеть, дефицит железа и цинка часто сосуществуют, что приводит к негативным взаимодействиям [158].

Цинк и железо поглощаются преимущественно в тонком кишечнике через транспортер DMT1. DMT1 обладает сродством к двухвалентным ионам металлов (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и др.), однако основным субстратом этого транспортера является железо. Теоретически длительный приём высоких доз железа может привести к накоплению железа в слизистой оболочке кишечника, нарушая механизмы транспорта цинка через транспортеры DMT1 и ZIP. Однако экспериментальные данные из исследования Дэвидссона и его коллег показали, что обогащение пищевых продуктов железом в разумных пределах не приводит к значительному снижению усвоения цинка, даже при длительном применении [158]. Поэтому, дефицит цинка может возникнуть при слишком высоком уровне железа [159, 160].

О'Брайен и соавторы [161] утверждают, что использование железа в дозе 60 мг/день конкурирует с цинком за транспортер DMT1 в тонком кишечнике, но одновременное добавление 15 мг цинка помогает сбалансировать соотношение Fe/Zn и минимизировать конкурентное взаимодействие. Бугле и др. [162] сообщили о значительной корреляции между всасыванием цинка и уровнем железа в рационе у крыс: увеличение железа в рационе приводило к снижению абсорбции цинка. Однако

Лённердал [163] предположил, что при потреблении железа ниже 25 мг и соотношении $\text{Fe/Zn} \leq 2:1$ железо не влияет на всасывание цинка.

Взаимодействие железа и цинка в основном зависит от дозы и соотношения Fe/Zn . Высокие дозы железа (>50 мг/день) без добавления цинка могут привести к дефициту цинка, особенно у уязвимых групп, таких как беременные женщины. Напротив, в физиологических дозах (≤ 25 мг Fe/день) этот эффект незначителен. Комбинирование обоих микроэлементов в рационе или добавках является оптимальной стратегией для обеспечения баланса.

Взаимодействие с медью

Медь (Cu) является важнейшим микроэлементом для человека и животных, занимая третье место по распространенности в организме после железа и цинка. Она играет важную роль во многих биологических процессах, включая активность ферментов, выработку энергии, а также функционирование нервной системы [164, 165].

Медь выполняет биохимическую функцию в качестве структурного кофактора для широкого спектра металлоферментов, катализирующих фундаментальные процессы клеточного метаболизма. Ее участие в восстановлении молекулярного кислорода обеспечивает поддержание базовых клеточных функций [164].

Среди ключевых медь-зависимых ферментов выделяются: цитохромоксидаза (комплекс IV дыхательной цепи); мультифункциональные купроферменты, включая церулоплазмин (медь-транспортирующий гликопротеин плазмы), Cu/Zn-SOD (супероксиддисмутаза внеклеточного матрикса) и аминоксидазы, которые способствуют регуляции транспорта железа в организме [166].

Антиоксидантный фермент Cu/Zn супероксиддисмутаза является важным ферментом, в составе которого участвуют медь и цинк. Он помогает снизить уровень

свободных радикалов в организме, предотвращая заболевания, связанные с повреждением клеток, такие как старение, хроническое воспаление и рак [167, 168]. Он играет ключевую роль в защите организма от вредных свободных радикалов, особенно аниона супероксида (O_2^-), катализируя реакцию превращения супероксида в перекись водорода (H_2O_2) и молекулярный кислород (O_2) [169, 170]. Перекись водорода затем разлагается другими ферментами, такими как каталаза или глутатионпероксидаза, на воду и кислород, что помогает минимизировать оксидативное повреждение клеток. Таким образом, присутствие избытка цинка может привести к замене цинка на медь в этом ферменте.

Многие исследования показали, что чрезмерное потребление цинка с пищей может привести к дефициту меди в организме человека [171, 172]. Основная причина заключается в том, что при повышении концентрации цинка происходит стимуляция выработки МТ, который имеет более высокое сродство к меди, чем к цинку, что подавляет всасывание меди в кишечнике, одновременно вызывает накопление меди в печени и влияет на процесс транспорта меди через плаценту [173-177].

Избыточное количество цинка в рационе конкурирует с медью за транспортные белки (DMT1 Divalent Metal Transporter 1 и ZIP4 Zrt/Irt-like Protein 4), а также стимулирует синтез металлотионеина, в результате чего медь задерживается в клетках кишечника и выводится с калом. Bremner и Young в 1976 году представили результаты своих экспериментов на овцах, показывающие, что отравление медью у овец может быть контролируемо путем увеличения количества цинка в организме [173].

Однако можно наблюдать, что, несмотря на снижение абсорбции меди при увеличении поступления цинка в организм, медь не влияет на всасывание цинка [178]. Причина этой асимметрии может быть обусловлена тем, что цинк имеет больше специализированных транспортных белков, чем медь, что позволяет поддерживать концентрацию цинка в организме даже при наличии избытка меди.

Взаимодействие с магнием

Магний выполняет функцию незаменимого элемента, участвуя в более чем 300 ферментных системах и контролируя сотни важных биохимических реакций в организме, особенно энергетический обмен. Магний не только участвует в синтезе ДНК, РНК и белка, но также регулирует деятельность мышечной ткани, нервной системы, развивает костную структуру, контролирует уровень сахара в крови и способствует снижению артериального давления [179]. Кроме того, магний выполняет функцию активного транспорта ионов кальция и калия через клеточные мембраны, способствуя стабилизации мембранного потенциала, поддерживая проведение нервных импульсов, а также обеспечивая мышечные сокращения и поддержание нормального сердечного ритма [180].

Механизм ингибирования всасывания магния цинком в настоящее время остается неясным из-за различий в местах абсорбции между этими двумя элементами. Считается, что цинк абсорбируется в тонком кишечнике [181], но основное место всасывания цинка в организме человека по-прежнему является предметом обсуждения [159]. Используя методы перфузии тонкого кишечника у здоровых людей, Steinhardt H.J. и Adibi S.A. в 1984 году продемонстрировали, что основными зонами абсорбции цинка в кишечнике человека являются как двенадцатиперстная [88], так и тощая кишка [181], при этом двенадцатиперстная кишка являлась основной зоной [182], а в остальных местах тонкого кишечника абсорбция происходит в меньшей степени.

Исследования на крысах зафиксировали, что наибольшая абсорбция наблюдалась в двенадцатиперстной и подвздошной кишке [183] или только в подвздошной кишке или тощей кишке [181]. В то же время магний, напротив, абсорбируется практически во всех отделах тонкого кишечника. Различия в основных зонах абсорбции между цинком и магнием привели к гипотезе об отсутствии конкуренции между этими элементами в процессе усвоения.

Однако исследование Herta Spencer и коллег выявило, что цинк может ингибировать абсорбцию магния при наличии кальция [184]. Примечательно, что магний не оказывает отрицательного влияния на усвоение цинка в организме [25]. Однако прием цинка в высоких дозах (142 мг/день) не только подавляет абсорбцию магния, но и вызывает дисбаланс магния в организме [184].

Несмотря на возможную биологическую конкуренцию в определенных условиях, цинк и магний также проявляют синергетический эффект в поддержке жизненно важных биологических функций. Оба элемента выступают незаменимыми кофакторами многих ключевых ферментов.

Цинк выступает структурным микроэлементом более чем трёхсот ферментов, включая карбоангидразу (катализирует гидратацию CO_2), ДНК-полимеразу (обеспечивает точность репликации) и супероксиддисмутазу (нейтрализует реактивные формы кислорода) [15, 17, 42]. Магний выполняет роль незаменимого кофактора для ферментов, регулирующих энергетический обмен (АТФазы, киназы) и биосинтез нуклеиновых кислот (ДНК- и РНК-полимеразы) [179, 181]. Комбинация этих двух минералов оптимизирует ферментативную активность, особенно для ферментов, требующих одновременного присутствия Zn и Mg. Клиническое исследование Namedifard и коллег у пациентов с диабетом 2 типа и ишемической болезнью сердца продемонстрировало эффективность комбинированной добавки Zn-Mg: уменьшение симптомов у пациентов с болезнью Альцгеймера и депрессией; снижение уровня С-реактивного белка (СРБ, маркер воспаления) на 38% у пациентов с болезнью сердца; улучшение контроля гликемии: снижение HbA1c на 1,2% при диабете [185].

Взаимодействие с кальцием

Всасывание цинка не зависит от содержания в пище кальция или приема лекарственных препаратов, содержащих кальций. Исследование Лённердала по добавлению кальция в коровье молоко в концентрациях 1300 мг/л и 500 мг/л не привело к значительным изменениям в абсорбции цинка [163]. Аналогичным образом, описано добавление высоких доз кальция во время еды и не обнаружено никакого влияния на усвоение цинка у взрослых [186]. Yan и соавтор провели эксперимент с добавлением кальция 1000 мг/день у женщин Гамбии, в итоге не наблюдалось различий в уровне цинка в плазме по сравнению с контрольной группой [187].

Сам кальций не взаимодействует напрямую с цинком, но в сочетании с фитатом они образуют в кишечнике нерастворимый комплекс Ca–Zn–фитат, снижающий всасывание цинка [188, 189]. Многие исследования предполагают, что молярное соотношение $[\text{фитат}] \times [\text{Ca}]/[\text{Zn}]$ является инструментом прогнозирования биодоступности цинка [190].

Взаимодействие с кадмием

Кадмий (Cd) классифицируется как самый токсичный тяжелый металл, его токсичность широко изучена и описана. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Cd вызывает серьёзное загрязнение окружающей среды и угрожает здоровью человека и животных.

Кадмий нарушает антиоксидантную систему, ингибируя ферменты (например, супероксиддисмутазу), изменяет экспрессию генов, проницаемость клеточных мембран и функцию ионных каналов. Примечательно, что методы лечения отравления Cd до сих пор не стандартизированы и недостаточно изучены в клинических испытаниях [191].

Многочисленные исследования показывают, что цинк способен снижать токсичность и канцерогенный риск Cd за счёт следующих механизмов:

- прямая конкуренция — Zn и Cd используют одни и те же транспортеры двухвалентных металлов (DMT1, ZIP), что уменьшает поглощение Cd клетками [192, 193];
- цинк регулирует металлосвязывающий белок металлотионеин, снижая токсичность Cd.

Экспериментально было обнаружено, что добавление Zn значительно снижает острую нефротоксичность, вызванную Cd, у крыс [194], а концентрации Cd у домашнего скота были обратно пропорциональны концентрациям Zn. Таким образом, увеличение потребления цинка является профилактической мерой против интоксикации Cd, особенно для групп высокого риска (работники промышленности или люди, проживающие в зонах риска воздействия Cd).

Взаимодействие со свинцом

Свинец (Pb) — это высокотоксичный тяжёлый металл, оказывающий серьёзное воздействие на здоровье человека, включая риск развития рака, неврологических нарушений и задержки роста [195]. Многочисленные исследования на животных и пациентах подтвердили, что цинк (Zn) способен снижать токсичность свинца. У животных, получавших высокие дозы цинка, было выявлено предотвращение ингибирования сокращения гладких мышц, вызванного свинцом [196], а также повышена защита от неврологических повреждений у жеребят [197].

Исследования Чисолма и др. (1981) на детях, подвергшихся воздействию свинца, показали, что цинк значительно снизил ингибирующий эффект свинца на эритропоэз [198]. Кроме того, цинк ингибирует образование свободных радикалов и защищает ДНК от повреждения свинцом через антиоксидантный механизм

[199]. Приём цинка является стратегией поддержки групп с высоким риском отравления свинцом, однако следует уделять внимание правильной дозировке, чтобы избежать отравления цинком из-за высоких доз.

1.3 Цинкосодержащие биологически активные вещества: современные вызовы и стратегии разработки

1.3.1 Ограничения в создании биодоступных форм

В организме человека отсутствует специализированная система хранения цинка, так как поддержание его уровня полностью зависит от поступления этого микроэлемента через рацион питания или с лекарственными препаратами и биологически-активными добавками [200]. Несмотря на наличие отдельных транспортных систем, цинк не имеет запасных белков, таких как ферритин (для железа) и церулоплазмин (для меди).

На фармацевтическом рынке популярные позиции среди цинкосодержащих препаратов занимают соединения различной химической природы, включая цитрат, глюконат, глицинат, оксид и сульфат цинка. Большинство этих соединений обладают различной степенью гидрофильности, однако оксид цинка демонстрирует минимальную растворимость в водных средах [201]. Согласно клиническим рекомендациям ВОЗ, для коррекции электролитных нарушений при педиатрических диарейных синдромах предпочтение отдается водорастворимым формам — сульфату, ацетату и глюконату цинка, что связано с их высокой биодоступностью [202]. Однако ацетат цинка и сульфат цинка имеют горький, вяжущий вкус и должны быть приготовлены в виде сиропа, чтобы не вызвать рвоту у детей [203].

Дефицит железа и цинка часто сосуществует, а ингибирующее действие этих элементов проявляется только при крайне высоких концентрациях железа, поэтому

рекомендуется их совместное использование в нанокompозитах [204, 205]. Некоторые соединения усиливают всасывание цинка, такие как пиколиновая кислота, витамин В6, цитрат и аминокислоты, такие как глицин, гистидин, лизин, цистеин и метионин [206].

Органические формы цинка (цитрат, глюконат, глицинат) обладают более высокой биодоступностью по сравнению с неорганическими формами (оксид, сульфат) из-за различий в химической структуре и механизмах всасывания в организме. Согласно исследованию, опубликованному Брауном и соавторами [207], для разработки цинксодержащих биологически активных добавок следует выбирать водорастворимые соли цинка, такие как сульфат, глюконат или ацетат.

Несмотря на высокую растворимость в воде, сульфат цинка (ZnSO_4) легко взаимодействует с фитатом (содержащимся в цельнозерновых продуктах в ЖКТ), образуя нерастворимые комплексы, что снижает биодоступность (с 54,7% до 29,3% по данным ВОЗ).

Однако комбинация ZnSO_4 с витамином С (аскорбиновой кислотой) в лекарственном препарате может улучшить усвоение благодаря подавлению фитата и усилению метаболизма цинка. Многочисленные исследования показали, что аскорбиновая кислота не оказывает прямого влияния на усвоение цинка в кишечнике [208, 209] поскольку, в отличие от железа, цинк не участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Этот вывод подтверждается исследованиями Сандстрёма и соавторов, которые подтвердили, что приём витамина С не оказывает существенного влияния на биодоступность цинка [210].

Однако цитрат оказывает положительное влияние на абсорбцию цинка благодаря своей способности образовывать растворимый комплекс с цинком, помогая улучшить транспорт через слизистую оболочку кишечника [211]. Хотя витамин С не воздействует напрямую, он может снижать ингибирующий эффект фитатов — антинутриентов, распространённых в злаках и бобовых. Фитат образует нерастворимые комплексы с цинком, препятствуя его всасыванию [189, 212].

Благодаря своим восстановительным свойствам витамин С помогает разрушать структуру фитатов, косвенно увеличивая количество свободного цинка, доступного для всасывания [213].

Комбинация цинка и витамина С доказала свою эффективность в укреплении иммунитета, профилактике инфекционных заболеваний (простуды, сезонного гриппа и др.) — актуальных проблем здравоохранения XXI века.

Органические соли цинка, такие как ацетат и лактат, особенно в форме аминокислотных хелатов, демонстрируют превосходную биодоступность по сравнению с неорганическим сульфатом цинка [214, 215]. Хелатная структура глицината защищает цинк от осаждения фитатом и конкуренции с другими элементами в ЖКТ благодаря своей органической молекулярной «оболочке» [216].

Кроме того, хелат цинка абсорбируется через ионные каналы и систему транспорта аминокислот (пептидный переносчик), что повышает эффективность всасывания в кровь. При сравнении с глюконатом цинка цитрат цинка не только обладает эквивалентной биодоступностью (обе формы повышают уровень цинка в сыворотке на 25% выше, чем оксид цинка), но и является более экономичным вариантом. Таким образом, выбор оптимальной формы цинка требует учёта цели применения, целевой аудитории и бюджета [211].

1.3.2 Перспективные направления модификации лигандов

Сегодняшние задачи при разработке цинксодержащих лекарственных препаратов и биологически-активных добавок заключаются в оптимизации биодоступности за счет улучшения растворимости цинка в физиологической среде, снижения антагонистических взаимодействий с другими элементами и ограничения влияния пищи на стабильность цинка. В настоящее время наноинкапсуляция, нанотехнологии и использование биологических соединений, экстрагированных из

растений, в качестве комплексообразующих веществ цинка становятся ключевыми тенденциями.

Нанотехнологии произвели революцию во многих областях: от сельского хозяйства, пищевой промышленности, фармацевтики до медицинской диагностики и лечения. Наночастицы играют ключевую роль в повышении биодоступности активных соединений, особенно при пероральном применении. Однако потенциальная токсичность систем доставки на основе наночастиц остается серьезной проблемой [216, 217].

Недостатком традиционного неорганического цинка является его низкая биодоступность из-за низкого всасывания. Нанотехнологии позволили преодолеть этот недостаток путём создания наночастиц оксида цинка с ультрамалыми размерами (1–100 нм), высоким соотношением площади поверхности к массе и повышенной реакционной способностью [218]. Все это улучшает растворимость и всасывание цинка при минимальном его количестве. Однако исследования на животных подтверждают, что токсичность наночастиц по-прежнему требует внимания [219].

Наночастицы ZnO — одно из пяти соединений цинка, которые Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) признало безопасными [220]. Наночастицы ZnO демонстрируют уникальный потенциал в диагностике и лечении различных видов рака благодаря биосовместимости, биodeградируемости и способности избирательно индуцировать гибель раковых клеток. Наночастицы ZnO проявляют специфическую токсичность по отношению к раковым клеткам за счет генерации активных форм кислорода (АФК), нарушения мембранного потенциала митохондрий, активации каскада реакций, приводящего к апоптозу. Кроме того, наночастицы ZnO действуют как переносчики для доставки противораковых препаратов в опухолевые клетки, поддерживают стабильную концентрацию лекарств и уменьшают побочные эффекты [221, 222]. Помимо применения в лечении рака, наночастицы ZnO также обладают терапевтическими эффектами, включая

антибактериальное, противогрибковое, противовирусное, противодиабетическое, противовоспалительное, омолаживающее, ранозаживляющее и диагностическое действие [223-225].

Инкапсулирование цинка — это технология заключения цинка в полимерные, липидные или белковые материалы для создания наночастиц размером от 1 до 1000 нм, которая, как маяк в фармацевтической промышленности, указывает на перспективные направления развития этой отрасли [226].

Эта технология не только защищает цинк от агрессивной среды пищеварительного тракта, но и обеспечивает гибкое контролируемое высвобождение именно в тонком кишечнике, оптимизируя площадь контактной поверхности. Сочетание высокобиодоступных форм цинка (хелаты, цитраты) и современных технологий производства (наночастицы, инкапсулирование) открывает многомерный подход, обеспечивающий баланс между эффективностью, стоимостью и безопасностью при разработке продуктов, содержащих цинк.

1.4 Методы определения цинка и его токсичности

1.4.1 Рентгенофлуоресцентная спектроскопия (РФС)

Рентгеновская флуоресцентная спектроскопия (РФС) — метод качественного и количественного спектрального анализа химического состава материалов, основанный на вторичной эмиссии рентгеновских лучей в результате энергетических переходов электронов атомов. Каждый химический элемент испускает флуоресцентное излучение на характерной длине волны, что позволяет одновременно определять множество элементов в одном измерении [119].

Рентгенофлуоресцентная спектроскопия позволяет обнаруживать большинство химических элементов периодической таблицы — от бериллия (Be, $Z = 4$) до урана (U, $Z = 92$) — в широком диапазоне концентраций от 0,1 ppm до 100%. Принцип действия этого метода основан на воздействии рентгеновских лучей высокой энергии (первичное рентгеновское излучение). Посредством рентгеновского облучения электроны выбиваются из внутренних орбиталей с образованием вакансии. Эта вакансия быстро заполняется электронами с внешних орбиталей более высоких энергетических уровней с испусканием вторичного рентгеновского фотона. Каждый химический элемент излучает фотоны с уникальной длиной волны, что позволяет идентифицировать его по индивидуальному спектральному «отпечатку» [266].

1.4.2 Атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС)

Атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС) — метод элементного анализа, принцип которого заключается в термо-индуцированном возбуждении атомов или ионов, переведенных в газообразное состояние. В процессе перехода из возбужденного состояния в основное испускаемое электромагнитное излучение фиксируется детектором, формируя спектр с дискретными линиями, специфичными для каждого элемента. Также указанный метод применяется при количественном анализе (измерения интенсивностей спектральных линий, пропорциональных концентрации элемента в образце). При термическом возбуждении атомов электроны переходят в возбуждённое состояние и спонтанно возвращаются на более низкие энергетические уровни через 10^{-9} – 10^{-8} секунд. Избыточная энергия высвобождается в виде особого электромагнитного излучения с длинами волн преимущественно в видимой и ультрафиолетовой областях. Каждый элемент обладает уникальным набором спектральных линий — так называемым характеристическим спектром излучения. В АЭС выбор методов атомизации и возбуждения зависит от агрегатного

состояния пробы. Для анализа твердых образцов применяют электротермические методы — электрическую дугу, искровой разряд или лазерную абляцию. Жидкие пробы, напротив, чаще анализируют с использованием высокотемпературной индуктивно связанной плазмы (ИСП). Температурный режим варьируется в широких пределах: от 1500°C до 12000°C, что обеспечивает эффективное возбуждение даже тугоплавких элементов [227]. Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) использует плазму — ионизированный газ, содержащий атомы, создаваемые высокочастотным электромагнитным полем. Филипп Шаппюи и его исследовательская группа успешно применили этот метод для анализа содержания цинка, меди и алюминия в образцах крови [228].

Несмотря на то, что методу характерна высокая воспроизводимость и высокая точность, которая составляет $\pm 1\%$, что объясняется малой систематической погрешностью, данный метод анализа отличается значительными финансовыми затратами, связанными не только с приобретением специализированного оборудования, но и с необходимостью регулярного обновления комплектующих. Высокая себестоимость анализа, особенно при работе с многокомпонентными матрицами, сужает область их практического использования в фармацевтическом анализе.

1.4.3 Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС)

Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) представляет собой ключевой аналитический метод в фармацевтическом анализе, применяемый для идентификации и количественного анализа элементов в составе фармацевтических субстанций. Каждый элемент характеризуется уникальной длиной волны поглощаемого излучения, что обеспечивает высокую селективность анализа. Основу методики составляет регистрация поглощения монохроматического излучения резонансного типа

свободными атомами, находящимися в газовой фазе после атомизации пробы. Как ключевой метод анализа металлов [229], ААС использует специализированные источники излучения, такие как лампы с полым катодом и безэлектродные разрядные лампы. Важным этапом анализа является атомизация образца — процесс превращения жидкой пробы в атомарный пар, а следовательно для данного метода характерна сложна пробоподготовка.

Атомизацию соединений проводят преимущественно пламенным или электротермическим способами. Пламенная атомизация подразумевает использование горючих газовых смесей (ацетилен/воздух или ацетилен/оксид азота), в пламя которых вводится аэрозоль анализируемого раствора. Электротермическая атомизация реализуется в графитовых печах, где сухой остаток пробы испаряют ступенчато при температурах 2000–3000°C и этот способ обеспечивает образование свободных атомов в газовой фазе [230]. В данном температурном интервале не более 1% атомов находятся в возбужденном состоянии, а остальные сохраняют основное состояние, что минимизирует помехи и обеспечивает точность измерений.

1.4.4 Методы доклинических испытаний токсичности цинка

Определение токсичности цинка у простейших

В условиях растущего загрязнения тяжелыми металлами из-за промышленной и сельскохозяйственной деятельности оценка токсичности ионов металлов на экосистемы и здоровье человека становится крайне актуальной. Простейшие микроорганизмы поддерживают свою важную в фармацевтической экологии позицию посредством двух характерных функций: как биоиндикаторы, отражающие токсичность металлов через динамику популяции (изменение численности), и как

идеальные системы биотестирования благодаря своей способности выражать четкие клеточные реакции на токсины.

Особое преимущество данной группы организмов обусловлено их эукариотической клеточной структурой, которая позволяет моделировать воздействие металлов на высшие организмы благодаря сходству биохимических механизмов. Кроме того, короткий репродуктивный цикл (обычно *Tetrahymena pyriformis* завершает деление клеток через 2–4 часа), простота культивирования и низкая стоимость исследований делают их идеальными моделями для оптимизации ресурсов и времени. Многочисленные исследования, включая работы Le Dû A. (1993) [231] и Pauli W. с соавт. (1993) [232], подтвердили эффективность использования простейших при оценке токсичности ионов меди и цинка, открыв перспективы замены позвоночных животных в токсикологических исследованиях [233].

Поразительный научный парадокс, продемонстрированный исследованием Мадони П. и соавторов [234, 235], которые обнаружили, что токсичность цинка превышает токсичность меди для популяций *T. pyriformis* в активном иле, что противоречит результатам, полученным для водных сред. Это подчёркивает важность учёта форм нахождения металлов (свободные ионы, комплексы), окислительно-восстановительных условий и особенностей тестовых популяций. В этом контексте *Spirostomum ambiguum* выделяется как превосходная модельная система благодаря своему размеру от 2 до 4 мм, который можно наблюдать невооруженным глазом, а под микроскопом можно напрямую наблюдать явление сжатия клеток при воздействии ионов металлов. Применение этого клеточного биосенсора полностью удовлетворяет принципу 3R: сокращает количество позвоночных в доклинических испытаниях на 80% (Reduce), устраняет болевой фактор благодаря простой нейронной структуре (Refine) и предоставляет эффективную альтернативную модель (Replace) для исследований острой токсичности металлов.

Однако серьезная проблема заключается в вариабельности результатов между штаммами простейших, особенно в отношении переходных металлов, таких как кадмий и ртуть, потенциал биоаккумуляции которых значительно различается в зависимости от вида. Необходимо разработать многомерную базу данных (учитывающую жесткость воды, температуру, концентрацию органических веществ) для повышения надежности экстраполяции результатов на высших животных и человека.

Можно сделать вывод, что такие простейшие, как *Tetrahymena pyriformis* и *Spirostomum ambiguum*, действительно являются оптимальным решением для оценки токсичности металлов, успешно сочетая экономическую эффективность, биологическую чувствительность и гуманизм в токсикологических исследованиях.

Определение токсичности цинка у млекопитающих

Острая токсичность цинка у животных проявляет значительную вариабельность в зависимости от используемой формы цинковой соли. Сообщается, что значения LD₅₀ при пероральном введении некоторых соединений цинка составляют 237–623 мг/кг для крыс и 86–605 мг/кг для мышей. При внутрибрюшинном введении значения LD₅₀ значительно снижаются 28–73 мг/кг для крыс и 32–115 мг/кг для мышей. Это различие отражает выраженное влияние пути всасывания и химических свойств цинковых солей на степень токсичности [236]. В целом, мыши проявляют значительно более высокую чувствительность к летальной токсичности цинка по сравнению с крысами. Среди цинковых соединений ацетат цинка демонстрирует наибольшую токсичность для крыс, за ним следуют нитрат цинка, сульфат цинка и хлорид цинка (Таблица 4).

Таблица 4. Полулетальные дозы (LD_{50} , мг/кг) различных форм цинка для мышей и крыс при пероральном и внутрибрюшинном приёме [236]

Название соединения	Животное			
	Крыса		Мышь	
	Перорально LD_{50} , мг/кг	Внутрибрюшинно LD_{50} , мг/кг	Перорально LD_{50} , мг/кг	Внутрибрюшинно LD_{50} , мг/кг
Цинка ацетат	794	162	287	108
Zn	237	48	86	32
Цинка нитрата	1330	133	926	110
Zn	293	39	204	32
Цинка хлорид	1100	58	1260	91
Zn	528	28	605	44
Цинка сульфат	1710	200	926	316
Zn	623	73	337	115

Длительное пероральное введение сульфата цинка крысам в дозировке 1,110 мг/кг/сутки провоцировало летальные исходы, что свидетельствует о кумулятивном токсическом действии [237]. Более выраженная острая токсичность отмечена при 90-дневном пероральном приеме ацетата цинка (191 мг Zn/кг/сутки), при этом смертность в группе грызунов достигла 20% [236].

Особую опасность представляет хлорид цинка для дыхательной системы. Прямое интратрахеальное введение соединения мышам вызывало тяжелые патологические изменения в легочной ткани. Напротив, оксид цинка не вызывает повреждения легких даже при использовании в относительно высоких концентрациях. Это различие обусловлено тем, что хлорид цинка легко растворяется в воде и легко проникает через

альвеолярные мембраны, провоцируя воспалительную реакцию и тканевые повреждения.

Оксид цинка, благодаря своей нерастворимости, обладает значительно меньшим потенциалом аналогичного токсического воздействия. Острая токсичность цинка у грызунов при краткосрочном пероральном воздействии (≤ 28 дней) проявляется такими симптомами, как потеря веса, анорексия, анемия, задержка роста, выпадение шерсти, а также изменение активности печёночных ферментов и дисфункция почек.

В 1991 году было установлено, что некоторые соли цинка (ацетат, хлорид, сульфат) обладают выраженным раздражающим действием на кожные покровы лабораторных животных [238].

Помимо показателей LD₅₀, исследование Аллена и соавт. (1983) предложило использовать овец (*Ovis aries*), как модельный организм для изучения оральной токсичности цинка у жвачных животных (*Ruminantia*). Это позволило установить такие патологические реакции, как повреждение поджелудочной железы, патологию ЖКТ, гепатопатию пищеварительного тракта у овец [239]. Модель отражает биомеханизм абсорбции цинка через рубцовые ворсинки и демонстрирует большую метаболическую аналогию с людьми по сравнению с грызунами.

Исследование абсорбции и транспорта цинка с использованием моделей кишечных клеток *in vitro*.

Модель клеток Сасо-2 человека широко применяется в *in vitro* исследованиях для изучения процессов абсорбции и транспорта цинка в кишечнике. Это инновационная экспериментальная платформа, основанная на культивировании клеток аденокарциномы толстой кишки человека (Сасо-2). Она позволяет воссоздавать структуру и функциональные характеристики эпителия тонкой кишки. Данная методология широко применяется в фармакологических исследованиях для

количественного анализа пассивной диффузии и активного транспорта перорально вводимых фармацевтических агентов, а также оценки кинетики усвоения биологически значимых нутриентов [240- 242].

Описанная выше одобренная FDA модель демонстрирует высокую корреляцию с частичной абсорбцией лекарственных средств у человека и широко применяется для изучения кинетики всасывания фармацевтических препаратов, микроэлементов (например, цинка) и компонентов питания [243].

При культивировании в течение 21 дня клетки Caco-2 дифференцируются в функциональное и морфологическое состояние, аналогичное клеткам кишечника человека. Они образуют неповрежденный монослой с ключевыми характеристиками кишечного эпителия, включая микроворсинки, белки плотных контактов и транспортеры, важные для всасывания питательных веществ [244]. Кроме того, эта система также помогает изучать влияние компонентов рациона на биодоступность цинка, тем самым выявляя взаимодействие питательных веществ в кишечной среде [242, 244].

Прогнозирование терапевтических и токсических свойств лекарственных средств на основе количественной корреляции “структура-активность”/ “структура свойство” (QSAR)

В современных исследованиях связь молекулярной структуры с биологической активностью является основой для разработки новых фармацевтических соединений. Метод QSAR использует математические модели для анализа корреляции между структурными характеристиками (такими как атомный номер, молекулярная геометрия, электронные свойства) и биологической активностью (такой как ингибирование ферментов, токсичность) и является перспективным методом прогнозирования новых соединений [245].

Метод количественных корреляций «структура-активность – структура-свойство» заключается в сопоставлении параметров, характеризующих структурные формулы химических веществ, с данными о биологической активности соответствующих химических соединений для поиска зависимости «дескриптор химической формулы – биологическая активность». Дескрипторами могут служить число атомов, геометрия молекулы и т. д.

Согласно анализу Паркина [246], уникальная роль цинка в биологических системах определяется совокупностью его физико-химических свойств. Во-первых, ион Zn^{2+} обладает способностью к образованию стабильных координационных связей с атомами азота, кислорода и серы, присутствующими в аминокислотных остатках (гистидин, цистеин, глутамат). Это обеспечивает формирование прочных комплексов с белками, регулируя их структуру и каталитическую активность. Во-вторых, у цинка отсутствует окислительно-восстановительная активность в физиологических условиях, что минимизирует риск образования реактивных кислородных видов [246].

Матриксные металлопротеиназы (ММП) — цинксодержащие ферменты, участвующие в деградации внеклеточного матрикса, представляют собой перспективную терапевтическую мишень в онкологии [246]. Цинк играет центральную роль в активном центре фермента, стабилизируя его структуру и регулируя каталитическую активность. Поэтому ингибиторы металлопротеиназ часто воздействуют на ионы цинка, блокируя функцию фермента. Исследования QSAR направлены на анализ взаимосвязи между этими молекулярными структурными особенностями и способностью ингибировать указанные ферменты.

Метод QSAR не только оптимизирует разработку лекарственных препаратов, но и открывает новый подход к исследованиям в области лечения рака, основанный на прочной научной базе [247, 248].

Существуют научные статьи, которые описывают топологический анализ, метод Spirotox и микробиологические анализы для оценки активности комплексов хелатных

соединений цинка [249]. Это исследование также продемонстрировало потенциал применения упрощённой модели QSAR, основанной на топологических дескрипторах, для анализа и прогнозирования активности хелатных соединений цинка. Такой подход не только оптимизирует молекулярный дизайн, но и открывает новые направления исследований в разработке специфических ингибиторов, воздействующих на механизм образования биопленки — важный фактор устойчивости к антибиотикам при лечении хронических инфекций [249].

Интеграция топологических дескрипторов в модели QSAR демонстрирует гибкость этого метода, особенно при анализе разнообразных химических взаимодействий, включая металл-лигандные связи (например, цинк-метионин). Это способствует расширению применения QSAR в фармацевтическом анализе, фармакологии и биотехнологии.

ВЫВОДЫ ПО ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ

Цинксодержащие лекарственные средства и биологически-активные добавки обладают значительной биологической активностью, но требуют тщательного изучения их безопасности и эффективности. Цинк, как эссенциальный элемент, играет ключевую роль в поддержании гомеостаза, участвуя в работе ферментов, регуляции иммунитета и нейропротекции. Однако его дефицит или избыток напрямую влияют на нормальное функционирование органов человека.

Особый интерес представляет изучение синергетических эффектов цинка в комбинации с другими микроэлементами, однако методические ограничения большинства исследований не позволяют однозначно оценить такие взаимодействия. Перспективным направлением признана разработка наночастиц цинка, повышающих его проникновение через гематоэнцефалический барьер и применяемых таргетной доставке до мишени. Дальнейшие разработки направлены на создание цинксодержащих препаратов, которые оптимизируют усвоение и минимизируют токсичность для организма. Для этого необходимы исследования различных форм цинка, которые объединяют цинк с биотранспортерами (например, аминокислотами, пептидами) или используют хелатные формы для повышения биодоступности при ограничении побочных эффектов. Одной из основных проблем является установление баланса между эффективными дозами и безопасными пороговыми значениями, особенно с учетом того, что избыток цинка может вызывать нарушения микроэлементного баланса (например, дефицит меди).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках экспериментальной части диссертационного исследования в качестве объектов анализа были выбраны активные фармацевтические субстанции сульфата цинка разной формы обводнения (сульфат цинка моно-, гекса-, гептагидрат). Физические и химические свойства сульфата цинка известны и описываются в Фармакопейной статье (ФС) ГФ РФ XV, Европейской фармакопее 11 (Ph. Eur.) и др. Исследования проводились с использованием РФС, методов динамического и малоуглового рассеяния света (DLS и LALLS), ИК-спектроскопии НПВО и Spirotox-тестирования.

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Фармацевтические субстанции

В работе использовались следующие активные фармацевтические субстанции: $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99,0%, Acros Organics, Испания), $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99,3 – 103,0%, Fluka, Германия), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99,0%, Sigma-Aldrich, США), MgCl_2 (99,0%, Sigma-Aldrich, США). Приготовленные растворы перечисленных субстанций готовили взвешиванием фармацевтических субстанций на аналитических весах ATL-80d4 (Acculab), затем растворы подвергались фильтрованию с помощью субмикронного фильтра (размер пор 0,22 мкм, Merck Millipore, США).

Концентрации растворов сульфата цинка для определения биологической активности составили от 0,001 моль/л до 0,1 моль/л.

2.1.2 Биологически активные добавки и лекарственные средства

«Цинка хелат» (ООО АС “Эвалар”, Россия), в составе содержит целлюлозу микрокристаллическую, цинка бисглицинат, гидроксипропилметилцеллюлозу, твин 80, полиэтиленгликоль, кальция стеарат, диоксид кремния аморфный, кроскармеллозу. Свидетельство о государственной регистрации № KZ.16.01.98.003.E.000043.01.20 от 20.01.2020 г.

«Цинк + витамин С» (ООО АС “Эвалар”, Россия), в составе содержит аскорбиновую кислоту, целлюлозу микрокристаллическую, цинка лактат, стеарат кальция растительного происхождения и диоксид кремния аморфный. Свидетельство о государственной регистрации № RU.77.99.88.003.E.011736.12.14 от 05.12.2014 г.

«Цинк хелат» (ООО Мирролла, Россия), в составе содержит цинка аминокислотный хелатный комплекс (глицинат), микрокристаллическую целлюлозу, крахмал кукурузный, тальк. Свидетельство о государственной регистрации СГР № AM.01.07.01.003.R.000390.11.20 от 27.11.2020.

«Цинкорол» (ООО Квадрат-С, Россия), в составе содержит цинка цитрат, целлюлозу микрокристаллическую, соли жирных кислот, гидроксипропилметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, диоксид титана. Свидетельство о государственной регистрации RU.77.99.88.003.E.002048.06.19 от 06.06.2019.

«Цинкит» (Верваг фарма Гмбх и Ко.Кг, Германия), в составе содержит сульфат цинка, лимонную кислоту, натрия гидрокарбонат, сорбитол, натрия цикламат, натрия сахаринат, ароматизатор. Свидетельство о государственной регистрации №RU.77.99.11.003.R.001393.06.20 от 01.06.2020г.

«Пиколинат цинка» (Грин Сайд ООО, Россия), в составе содержит носитель микрокристаллическая целлюлоза, пиколинат цинка, антислеживающий агент стеарат

кальция, антислеживающий агент диоксид кремния аморфный. Свидетельство о государственной регистрации СГР № АМ.01.06.01.003.Р.000159.08.21 от 19.08.2021.

«Цинктерал» (ЛП-№(000816)-(РГ-RU), Тева Оперейшнс Поланд Сп. з о.о., Польша), в составе содержит действующее вещество цинка сульфата моногидрат 124,0 мг, что соответствует цинку 45,0 мг; вспомогательные вещества: лактозы моногидрат 78,5 мг, крахмал картофельный 38,75 мг, повидон-К25 20,00 мг, тальк 12,38 мг, магния стеарат 1,37 мг; оболочка: гипромеллоза 6,897 мг, макрогол (полиэтиленгликоль) 0,448 мг, титана диоксид (E171) 1,79 мг, алюминиевый лак на основе красителя азорубин (E122) 0,865 мг. Регистрационный номер: П N011693/01 от 25.09.2008.

2.1.3 Растворители

В экспериментальной работе для приготовления изучаемых растворов применялась высокоомная деионизированная вода, полученная на установке Milli-Q (Merck Millipore, США). Удельное сопротивление воды после очистки составляло 18,2 МОм·см при температуре 25°C, что соответствует стандартам для жидкостей высокой степени чистоты. Контроль качества воды включал анализ изотопного состава: концентрация дейтерия не превышала $140,0 \pm 1,0$ ppm, что исключало влияние тяжелых изотопов водорода на результаты исследований.

2.1.4 Дополнительные реактивы для исследований

В настоящей диссертационной работе были использованы следующие реактивы: NaCl (98%, Sigma-Aldrich, США), KOH (98%, ХИММЕД, Россия), H₂SO₄ (93,6–95,6 %, АЛЬДОСА, Россия).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Метод лазерного динамического светорассеяния (DLS, Dynamic Light Scattering)

Для определения размера частиц в исследуемых растворах сульфата цинка разной формы обводнения использовался метод динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания). Анализируемый образец облучается лазерным лучом, частицы непрерывно движутся и сталкиваются в растворе согласно броуновскому движению, что приводит к флуктуациям интенсивности светорассеяния [250].

В качестве источника излучения применялся лазер мощностью 4 мВт. Образцы объемом 1 мл помещали в одноразовые полистирольные кюветы, измерения проводили в трех повторях ($n=3$). Анализируемый диапазон размеров частиц охватывал интервал от 1 нм до 10 мкм, при этом погрешность измерений не превышала $\pm 10\%$. Для водных растворов сульфата цинка показатель преломления составлял 1,333, что соответствует типичным значениям для водных сред и подтверждает отсутствие значительных примесей. Результаты анализа дисперсности образцов графически представлены в виде зависимости интенсивности или объёма (%) от диаметра частиц (нм), что позволяет визуализировать распределение частиц по размерам.

Метод динамического светорассеяния (DLS) обладает рядом преимуществ, включая минимальные требования к подготовке образцов — для анализа достаточно раствора или суспензии без дополнительной пробоподготовки. Процедура занимает короткое время, что делает её удобной для серийных измерений, и позволяет проводить неразрушающий анализ частиц в ультрамалом диапазоне (1–1000 нм). Многопараметрический анализ (определение среднего размера частиц и индекса полидисперсности) и высокая чувствительность также являются преимуществами.

Недостатки метода: влияние пузырьков воздуха, что приводит к шуму сигнала; невозможность измерения крупных/плотных частиц из-за быстрого осаждения; необходимость измерения показателя преломления растворителя для точных расчётов. Таким образом, метод динамического светорассеяния (DLS) является быстрым, удобным и эффективным для анализа наночастиц, но требует однородности образца и отсутствия примесей.

2.2.2 Методы лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS, Low-angle laser light scattering)

В научной работе использовали метод лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS, Low-angle laser light scattering). Определение числового и объемного распределения частиц по размерам проводили с использованием анализатора «Malvern 3600 Ec». Также оборудование представлено измерителем дисперсности лазерным ИДЛ-1 «Кластер-1» (ИККХВ НАНУ, РУДН). Основные составляющие части измерительного блока: низкоэнергетичный гелий-неоновый лазер, излучающий монохроматический свет ($\lambda=633$ нм), проходящий через экспериментальную ячейку; фокусирующая оптическая система, состоящая из линз Фурье, фокусное расстояние 63 мм, 100 мм, 300 мм. Диапазон измерения размеров частиц 1–1000 мкм.

Растворы моно-, гекса- и гептангидрата сульфата цинка в концентрациях 0,01 и 0,001 моль/л готовили за 3 ч до измерения. Для проведения анализа образцов вносили 3 мл исследуемого раствора. Результаты анализа представляют собой распределение доли (%) от общего количества по размерам (мкм).

Преимущества метода: позволяет анализировать образцы большого размера, подходит для коллоидных растворов; быстрое время измерения; универсальность для разных типов образцов. Недостатки метода: невозможность измерения наночастиц;

требует однородных образцов без пыли/пузырьков воздуха (мешающие факторы); высокая стоимость оборудования.

2.2.3 Инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК НПВО)

Для определения гидратных модификаций сульфата цинка применяли метод ИК-Фурье спектроскопии с использованием спектрометра Cary 630 (Agilent, США), оборудованного алмазной приставкой для измерения в режиме нарушенного полного отражения. Исследования проводились в диапазоне 4000–650 см^{-1} с оптическим разрешением 2 см^{-1} , точностью позиционирования волнового числа $\pm 0,05 \text{ см}^{-1}$ и воспроизводимостью $\pm 0,005 \text{ см}^{-1}$.

На этапе подготовки субстанцию (5 мг) наносили равномерным слоем на поверхность алмазного кристалла и фиксировали с помощью прижимного механизма до аудиовизуального сигнала, подтверждающего оптимальный контакт между образцом и оптическим элементом. Управление прибором и регистрация данных осуществлялись через программное обеспечение MicroLab Expert, а обработка спектров — в среде ResolutionPro.

Результаты спектрального анализа представлены в виде зависимости оптической плотности в инфракрасной области (A , %) от волнового числа (ν , см^{-1}). Результаты ИК-спектра позволяют определить характерные полосы поглощения, соответствующие валентным и деформационным колебаниям связей, присутствующих в образце. Среди ключевых достоинств метода — отсутствие необходимости сложной пробоподготовки, неразрушающий характер исследования, высокая скорость измерений (подходит для серийного анализа), а также чувствительность к поверхностным структурам (покрытия, тонкие плёнки). Однако метод имеет ограничения: неоднородность или шероховатость образца ухудшают контакт с кристаллом, глубина проникновения ИК-излучения ограничена

поверхностным слоем, а использование алмазных элементов повышает эксплуатационные расходы.

2.2.4 Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия

Для качественного определения цинка и оценки примесей в цинкосодержащих лекарственных средств и биологически активных добавок применялся метод рентгеновской флуоресценции. Исследования проводились на спектрометре EDX-7000 (Shimadzu, Япония), который обеспечивает неразрушающий анализ элементного состава с высокой чувствительностью (Рисунок 3).



Рисунок 3. Оборудование - энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония)

Управление прибором и обработка данных осуществлялись с помощью специализированного программного обеспечения PCEDX-Navi, позволяющего автоматизировать процесс калибровки, регистрации спектров и их интерпретации.

Источником рентгеновского излучения служила трубка с родиевым анодом (Rh), функционирующая в режиме регулируемых параметров: напряжение 4–50 кВ, сила тока 1–1000 мкА. Для фокусировки излучения на образец использовался коллиматор с диаметром апертуры 10 мм. Аналитическая камера с размером $300 \times 275 \times 100$ мм позволяла размещать образцы различной геометрии, включая порошки в кюветах и компактные объекты. Регистрация флуоресцентного сигнала выполнялась кремниевым дрейфовым детектором. Для повышения точности измерений прибор автоматически подбирает фильтры, соответствующие длинам волн анализируемых элементов. Каждый элемент идентифицируется по характеристической энергии испускаемого излучения (кэВ).

Метод рентгенофлуоресцентного анализа был применен для определения содержания цинка, а также для подтверждения отсутствия мешающих примесей в фармацевтических субстанциях цинка сульфата разной формы обводнения и в БАД.

Исследуемые субстанции помещают в кювету в количестве, заполняющем кювету на высоту 3–5 мм. Закрывали поверхность кюветы майларовой пленкой. Для обеспечения статистической достоверности каждый образец анализировали в трех повторях ($n = 3$). Присутствие цинка в пробах было подтверждено по идентификации характеристических пиков флуоресценции в РФА-спектрах, соответствующих $K\alpha$ - (8,632 кэВ) и $K\beta$ -линиям (9,572 кэВ) цинка.

При проведении анализа методом РФА использование стандартных образцов для количественного определения содержания цинка в исследуемом образце является обязательным. Это связано с тем, что сигнал интенсивности рентгеновского излучения отражает только уровень эмиссии элемента, но не предоставляет прямых данных о его концентрации. Стандартные образцы не только обеспечивает согласованность результатов между лабораториями, но и позволяет проводить перекрестную проверку достоверности данных. Использование нескольких стандартных образцов необходимо в случаях, когда фоновый состав матрицы

анализируемого образца (например, органические вещества, минералы, влажность) не определен четко.

В данном исследовании использовали следующие стандартные образцы: SRM 2976 (NIST, США), стандартный образец состава Элодеи канадской ЭК-1 (ГСО 8921–2007; СО КООМЕТ 0065–2008-RU), стандартный образец состава листа берёза ЛБ-1 (ГСО 8923-2007; СО КООМЕТ 0067–2008-RU).

Значения интенсивности сигнала изучаемых элементов были пересчитаны на концентрации (%) по пропорции:

$$I_{\text{реф}}/I_{\text{афи}} = C_{\text{реф}}/C_{\text{афи}} \quad (3)$$

где $I_{\text{реф}}$, $C_{\text{реф}}$ – интенсивность сигналов и концентрация (%) референс-образца.

$I_{\text{афи}}$, $C_{\text{афи}}$ – интенсивность рентгеновской флуоресценции и неизвестная концентрация (%) анализируемого образца.

Преимущества метода: неразрушающий анализ образцов; быстрое время анализа; широкий диапазон обнаружения и одновременное обнаружение нескольких элементов (от Na до U) с концентрациями от ppm до 100%; измерение всех форм: от жидких до твердых. Недостатки метода: высокая стоимость оборудования; только идентифицирует элемент, не предоставляя никакой информации о химических связях или молекулярной структуре.

2.2.5 Метод оценки биологической активности Spirotox

Spirotox-тест является методом с использованием простейших *Spirostomum ambiguum* для оценки острой токсичности водорастворимых фармацевтических субстанций, основанным на влиянии концентрации исследуемого образца и температуры на время выживания инфузорий. *Sp. ambiguum* очень чувствителен к тяжелым металлам, фунгицидам, препаратам при заболеваниях сердца и нервной системы [258].

Биообъект обладает вытянутым лентовидным телом длиной 2–4 мм, слегка уплощённым в дорсо-вентральной плоскости (Рисунок 4).



Рисунок 4. Внешний вид *Sp. ambiguum*

Sp. ambiguum способен изгибаться в спираль (характерная особенность рода *Spirostomum*). При раздражении *Sp. ambiguum* проявляет быструю сократительную способность благодаря мионемным волокнам в клетках. Отсутствие жёсткой клеточной стенки обеспечивает высокую скорость реакции на внешние раздражители. Передвижение в водной среде осуществляется за счёт синхронной работы ресничек, равномерно распределённых по поверхности тела. Пропорции организма составляют примерно 1:10 (ширина к длине). В клетке выделяется крупный макронуклеус зернистой структуры, а ротовой аппарат, расположенный в передней части, продолжается до задней трети тела, обеспечивая эффективный захват пищи.

Инфузории культивировали в стеклянных сосудах ёмкостью 25 мл при поддержании температуры в диапазоне 20–24°C (Рисунок 5). В качестве питательной среды использовали питьевую воду с пониженным содержанием минеральных

веществ. Кормление инфузорий осуществляли дважды в неделю, внося в каждую ёмкость порцию из 3–5 дрожжевых гранул.

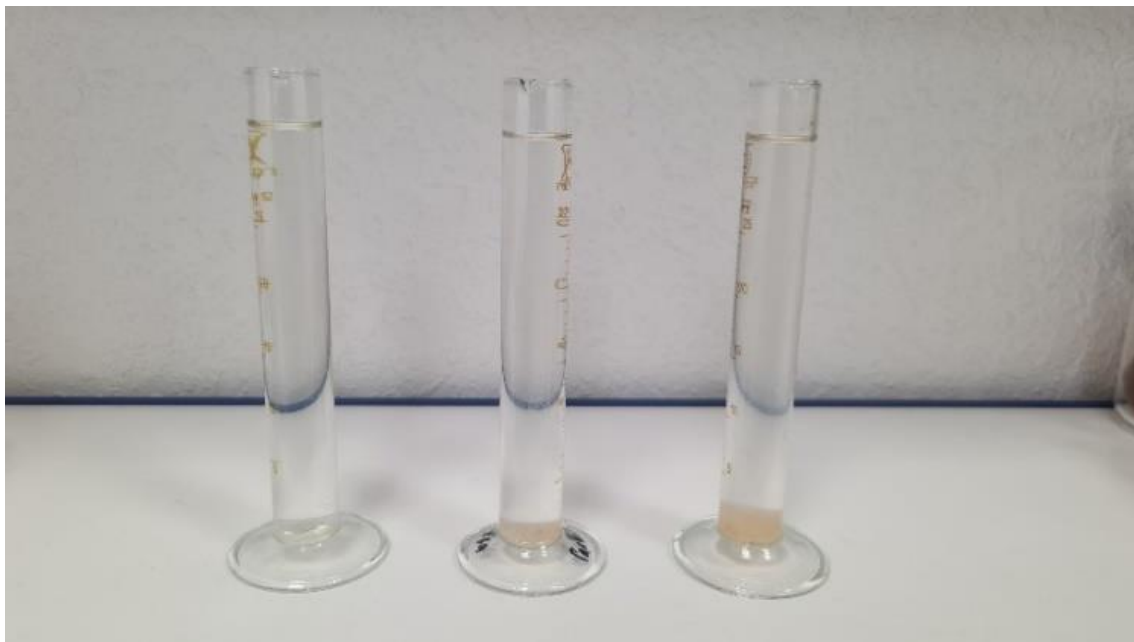


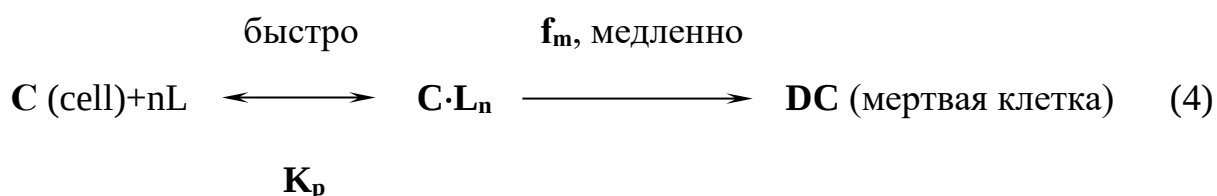
Рисунок 5. Среда культивирования инфузорий в стеклянных цилиндрах

При благоприятных условиях ($\text{pH}=5,0 - 8,0$, $T=19-32^{\circ}\text{C}$, слабоминерализованной среде культивирования) инфузории не погибают в течение 20 часов. Благодаря своей гибкости в условиях изменяющегося значения pH инфузории также считаются методом определения связи между токсичностью вещества и pH среды. Зависимость между токсичностью и значением pH раствора установлена на модели Spirotox для антидепрессантов [252] и нитрофенола [253]. Исследование проводили с помощью термостатируемого 5-луночного планшета с установленной температурой от 22°C до 32°C с шагом в 2°C (Lauda Alpha 6, Germany). Для освещения использовали маломощные лампы (~ 10 Вт) дневного света, бинокляр микроскопа для наблюдения за поведением инфузории (Рисунок 6).



Рисунок 6. Установка для биотестирования

В каждую термостатируемую ячейку вносили по 300 мкл анализируемого образца и пипеткой с диаметром носика более 1 мм, отсаживали в них по одной инфузории *Sp. ambigua*. Исследования *Sp. ambigua* выявили, что в процессе лиганд-индуцируемой гибели клеток образуется переходное состояние, кинетика которого аналогична закономерностям ферментативных реакций Михаэлиса-Ментен [254]. Для характеристики биологической активности водных растворов анализировали диаграммы «концентрация–время жизни» и графики зависимости времени жизни инфузории *Sp. ambigua* от температуры [255]. Кинетическая схема взаимодействия лиганд–индуцируемой гибели *Sp. ambigua* имеет следующий вид:



где K_p - константа равновесия обратимой стадии, f_m - константа скорости необратимого перехода клетки в мертвое состояние, С-клетка, L-лиганд, n-

стехиометрический коэффициент, C.Ln- промежуточное состояние (клетка после взаимодействия с лигандом), DC-мертвая клетка.

На первой стадии наблюдали первое быстрое сокращение инфузорий, происходящее сразу после внесении инфузорий в термостатируемую ячейку с цинком и образуется промежуточное состояние. Биологически активные соединения выступают в роли лигандов, связывающихся со специфическими рецепторами на нативных клеточных структурах

Вторая стадия протекает медленнее, длится от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от концентрации цинка в растворе. На этой стадии ионы цинка постепенно проникают через мембрану и вызывают гибель клетки.

Продолжительность жизни клеточного биосенсора определяли как период от начала посадки до наступления клеточной смерти. Признаками гибели инфузорий являются отсутствие движения, разрыв клеточной мембраны с выходом содержимого протоплазмы наружу, а также помутнение цвета клеток под микроскопом. В условиях лиганд-индуцированной трансформации клеток наблюдалась линейная зависимость между продолжительностью жизни инфузорий и температурными параметрами при анализе в координатах Аррениуса. Данная корреляция позволяет рассчитать энергию активации процессов клеточного перехода, что согласуется с термодинамическими принципами биологических систем. Значение вариабельности рассчитывали исходя из $n=5-10$ повторов.

Полученные результаты позволили получить параметр кажущейся энергии активаций ($^{obs}E_a$). Время жизни инфузорий зависит от состояния самой инфузории, но эта наблюдаемая энергия активации не зависит от состояния культуры клеток и соответствует химическому составу исследуемого образца.

Уравнение Аррениуса имеет следующий вид:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (5)$$

где, k – константа скорости процесса;

A – предэкспоненциальный множитель;

R – универсальная газовая постоянная;

T – абсолютная температура по шкале Кельвина.

После логарифмирования уравнение выглядит следующим образом:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (6)$$

Уравнение Аррениуса в логарифмическом представлении приобретает линейную форму, аналогичную уравнению прямой $y = a + bx$. Это позволяет использовать полулогарифмические координаты, где по оси абсцисс откладывается величина $x = \ln k$, а по оси ординат — обратная температура $y = 1/T$. Угловым коэффициентом наклона полученной прямой ($\tan \beta$) связан с энергией активации ($^{obs}E_a$) процесса лиганд-индуцируемой гибели под действием токсиканта через соотношение $\tan \beta = - E_a/R$. Таким образом, энергию активации рассчитывают по формуле $E_a = - R \cdot \tan \beta$ [119].

Экспериментальные значения $^{obs}E_a$, определяемые графическим методом в координатах Аррениуса, отражают зависимость скорости процесса лиганд-индуцируемой гибели от температуры и используются для количественной оценки устойчивости организма к токсическому воздействию.

Несколько исследований показали, что для соединений, чувствительных к инфузориям (особенно содержащих тяжелые металлы), наблюдаемая энергия активации во время медленной фазы процесса гибели клеточного биосенсора коррелирует с пероральной LD_{50} у лабораторных животных [256]. Исследование водных растворов и их воздействия на живые организмы, включая человека, требует четкого всестороннего понимания механизмов на всех уровнях биологической

организации — от молекулярного и клеточного до организменного и популяционного уровней. Благодаря короткому клеточному циклу и простым методам культивирования, Spirotox-тест признаётся надёжной биологической моделью, широко используемой в биоаналитических исследованиях.

2.2.6 pH-метрия

При описании методик определения подлинности и оценки чистоты фармацевтических субстанций контролировали значение pH изучаемых растворов. Для определения значения pH растворов использовали откалиброванный pH-метр базовый лабораторный РВ-11 (Sartorius, Германия). Для калибровки прибора использовали буферные растворы с pH 4; 7; 10 (NIST, США). Преимущества этого метода: Высокая точность и чувствительность (измерение pH до двух десятичных знаков), чувствительность даже к незначительным изменениям pH; дает мгновенные результаты, удобно отслеживает изменения pH с течением времени; простота использования.

Недостатки: pH зависит от температуры; требуется техническое обслуживание электродов, стеклянные электроды подвержены повреждениям, если их не погружать в консервирующий раствор (например, насыщенный раствор KCl); сложность измерения вязких образцов; для обеспечения точности результатов необходима периодическая калибровка с использованием стандартных буферных растворов (pH 4,01; 7,00; 10,01).

2.2.7 Высушивание фармацевтических субстанций

В соответствии с требованиями государственной фармакопейной статьи ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря массы при высушивании», уменьшение массы образца связано с удалением гигроскопической влаги и летучих компонентов. Данный показатель устанавливают методом термогравиметрии — высушиванием фармацевтической субстанции до постоянной массы. Навеску препарата точно взвешивали в бюксе, предварительно высушенном до стабильного веса.

Высушивание моно-, гекса- и гептагидрата сульфата цинка проводилось в сушильном шкафу FD23 (Binder, Германия) при рекомендованных фармакопейной статьей температуре 105°C и времени 3 ч. Время охлаждения каждого образца - 50 минут (в эксикаторе).

2.2.8 Метрологическое обеспечение

Полученные результаты обрабатывали статистически для получения среднего значения и среднеквадратичного стандартного отклонения (среднее $\pm$ SD) с использованием пакета программ OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США). Также для анализа методом РФА был применен стандарт МАГАТЭ – 2976 и стандартный образец состава Элодеи канадской ЭК-1 (ГСО 8921–2007; СО КООМЕТ 0065–2008-RU), листа берёза ЛБ-1 (ГСО 8923-2007; СО КООМЕТ 0067–2008-RU) для пересчёта количественного определения цинка в АФИ.

Для получения итогового результата наблюдений выполняли расчёт среднего арифметического значения:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad (7)$$

Вычисляли стандартное отклонение (или среднее квадратичное отклонение):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (8)$$

Относительное стандартное отклонение (%)

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (9)$$

Полуширину доверительного интервала $\Delta \bar{x}$ ($P=0,95$)

$$\Delta \bar{x} = \frac{t_{pf} \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

Где t_{pf} – коэффициент нормированных отклонений (критерий Стьюдента), который зависит от доверительной вероятности P и числа степеней свободы $f = n - 1$

Если объём выборки от 5 до 10, то исключение грубых промахов проводили с помощью Q-критерия:

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (11)$$

Где x_2 и x_{n-1} – значения вариант, ближайших по величине к крайним вариантам, а $R = x_n - x_1$ – разность между максимальным и минимальным значениями.

Таблица 5. Численные значения Q-критерия при доверительное вероятности $P=0,95$ и объёме выборки n

n	3	4	5	6	7	8	9	10
P=0,95	0,98	0,85	0,73	0,64	0,59	0,54	0,51	0,48

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В диссертационной работе показана возможность использования одноклеточного организма *Spirostomum ambiguum* для замены лабораторных животных при оценке токсичности соединений, содержащих цинк. Данный метод оптимизирует начальные этапы разработки новых лекарственных препаратов и обладает потенциалом для доклинического применения — упрощая и удешевляя стоимость исследований на ранних стадиях. С помощью метода Spirotox было установлено, что токсичность растворов гидратов сульфата цинка зависит от уровня pH. Наблюдения за динамикой сокращения клеток, лиганд-индуцируемой гибелью организмов и экспериментальное определение ^{obs}Ea подтвердили, что метод Spirotox может быть применен для оценки качества фармацевтических субстанций (ФС). Исследование токсичности при комбинированном действии ФС, содержащих соли магния и цинка отражает синергетическое взаимодействие между двумя указанными металлами, зависящее от соотношений магния и цинка в образце. Результаты применения Spirotox для оценки токсичности БАД показали, что состав вспомогательных веществ, оболочка таблеток и физико-химические свойства раствора, а также лекарственной формы цинксодержащей добавки являются факторами, влияющими на биологическую активность. Это делает метод перспективным инструментом для скрининга безопасности фармацевтических субстанций.

3.1 Исследование химического состава субстанций сульфата цинка методами ИК-НПВО и РФА

3.1.1 Спектральный анализ кристаллизованного сульфата цинка моно-, гекса-, гептагидрата в ИК-области

Для идентификации кристаллической фармацевтической субстанции сульфата цинка моно-, гекса-, гептагидрата было проведена ИК-спектрометрия. Результаты спектроскопии представлены на рисунке 7.

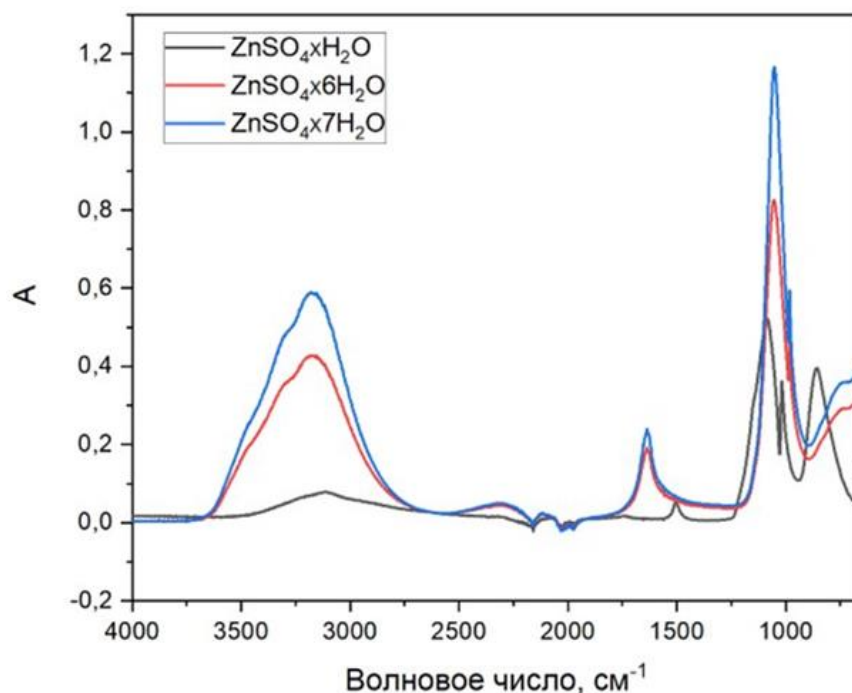


Рисунок 7. ИК-спектры сульфата цинка моногидрата (чёрный), сульфата цинка гексагидрата (красный) и сульфата цинка гептагидрата (синий)

Все исследованные фармацевтические субстанции проявляют интенсивную полосу поглощения в области 3000–3600 см⁻¹, характерно для валентных колебаний

гидроксильных групп воды [257]. На длине волны 1620 см^{-1} были зарегистрированы спектральные пики, характерные для деформационных колебаний гидроксильной группы молекул воды, с небольшими различиями в интенсивности между субстанциями сульфата цинка гекса- и гептагидрата. Разница в интенсивности максимумов при 3100 см^{-1} для гептагидрата и гексагидрата сульфата цинка по отношению к моногидрату сульфата цинка показывает влияние количества молекул воды на спектр. Присутствие значимых полос поглощения в области частот $1130\text{--}1080\text{ см}^{-1}$ свидетельствует о присутствии группы SO_4^{2-} .

Следовательно, спектроскопический анализ демонстрирует, что гидратированные формы сульфата цинка характеризуются дифференцированной интенсивностью поглощения в исследуемом спектральном диапазоне.

3.1.2 Рентгенофлуоресцентный анализ содержания цинка в фармацевтических субстанциях с использованием референс-образца

Метод рентгено-флуоресцентного анализа был применен для определения содержания цинка, а также для подтверждения отсутствия мешающих примесей в кристаллических фармацевтических субстанциях цинка сульфата разной формы обводнения. Качественное определение цинка в исследуемых образцах было доказано по наличию пиков характеристической флуоресценции на РФС-спектрах при K_α и K_β линиях цинка (8,632 и 9,572 кэВ, соответственно) (Рисунок 8).

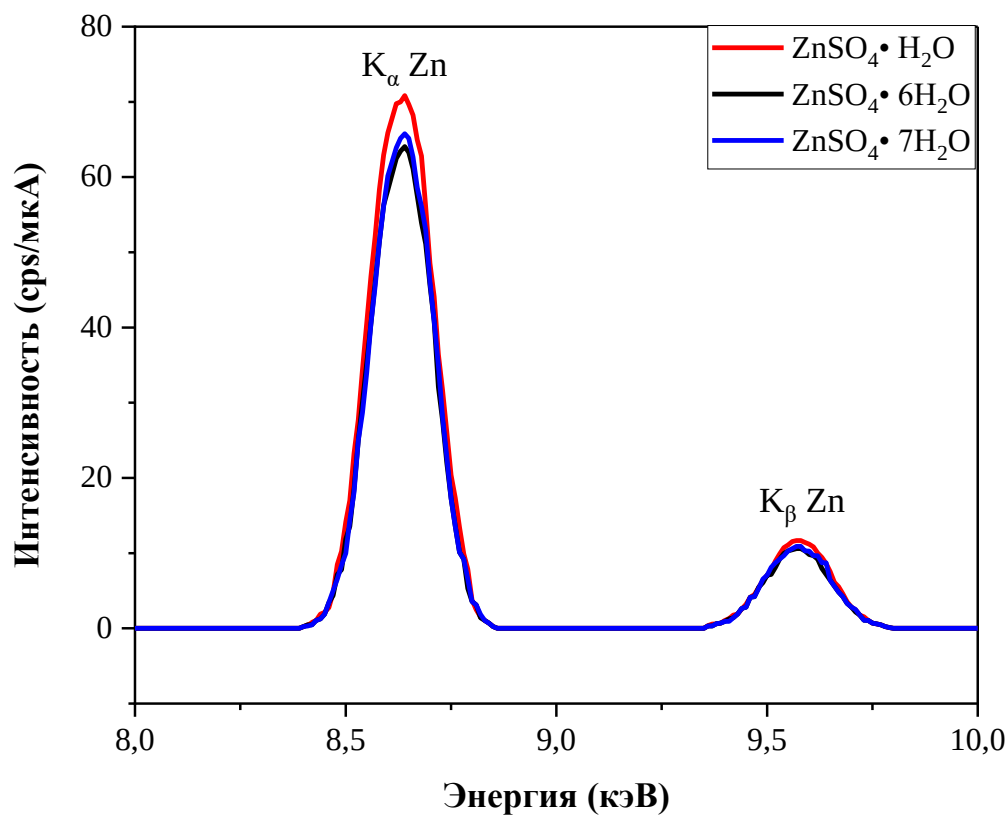


Рисунок 8. РФА-спектр сульфата цинка разной формы обводнения при характеристической энергии флуоресценции цинка - $K_{\alpha} = 8,632$ кэВ и $K_{\beta} = 9,572$ кэВ

В исследованиях количественного определения цинка в фармацевтических субстанциях был использован референс-образец NIST SRM-2976 с биологической матрицей, прошедший многоцентровую валидацию с участием 10 аккредитованных лабораторий (Европа, Канада, США), стандартный образец состава Элодеи канадской ЭК-1 (ГСО 8921–2007; СО КОOMET 0065–2008-RU) и стандартный образец состава листа берёза ЛБ-1 (ГСО 8923-2007; СО КОOMET 0067–2008-RU). ЭК-1 и ЛБ-1 утвержден ИГХ СО РАН и признан в качестве СО КОOMET решением 13-го заседания ТК 1.12 «СО» КОOMET (21.05.2008, г. Санкт-Петербург, Россия), внесен в реестр СО КОOMET под № СО КОOMET 0065–2008–RU (для ЭК-1) и СО КОOMET 0067–2008–

RU (для ЛБ-1) и допускается к применению без ограничений в России Армении, Беларуси, Болгарии, Грузии, Кыргызстане и Словакии и др. Сертифицированные концентрации (массовые доли) для цинка в SRM 2976–137 мг/кг, в ЭК-1 – 20,6 мг/кг, в ЛБ-1 – 94 мг/кг (Таблица 6).

Таблица 6. Пересчёт доли элементов в АФИ по разному стандартному материалу SRM-2976, ЭК-1 и ЛБ-1 (среднее $\pm$ SD, n=3)

Образец	SRM-2976	Элодея канадская ЭК-1	Лист Берёзы ЛБ-1
ZnSO ₄ ·H ₂ O	Zn: 17,1 $\pm$ 0,1 %	Zn: 17,5 $\pm$ 0,1 %	Zn: 9,7 $\pm$ 0,1 %
ZnSO ₄ ·6H ₂ O	Zn: 15,4 $\pm$ 0,1 %	Zn: 15,7 $\pm$ 0,1 %	Zn: 8,7 $\pm$ 0,1 %
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Zn: 15,6 $\pm$ 0,1 %	Zn: 15,9 $\pm$ 0,1 %	Zn: 8,8 $\pm$ 0,1 %

Рентгено-флуоресцентный анализатор измеряет интенсивность рентгеновского флуоресцентного излучения, которое испускают элементы в образце при воздействии первичного рентгеновского излучения. Полученный сигнал пропорционален концентрации элемента (количество атомов на единицу объёма), а не его общей массе в образце. Таким образом, содержание элементарного цинка в фармацевтической субстанции моногидрата сульфата цинка больше, чем в гекса- и гептагидратах сульфата цинка.

3.2 Оценка биологической активности цинксодержащих субстанций методом Spirotox и корреляция с LD₅₀

Для оценки биологической активности/токсичности растворов сульфата цинка разной формы обводнения использован метод Spirotox с помощью простейших одноклеточных организмов *Spirostomum ambiguum*. Для инфузории *Sp. ambiguum* характеризуется двухстадийная кинетическая схема. На первой стадии наблюдали первое быстрое сокращение инфузорий, происходящее сразу после внесении инфузорий в термостатируемую ячейку с цинком. Это явление обусловлено быстрым взаимодействием ионов цинка с рецепторами на поверхности клеточного биосенсора, которое называется промежуточное состояние клетки. Вторая стадия протекает медленнее, длится от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от концентрации цинка в растворе. На этой стадии ионы цинка постепенно проникают через мембрану, попадают внутрь клетки и вызывают гибель клетки.

Наблюдаемая реакция гибели инфузорий включала неподвижности или разрыв клеточной мембраны с выходом содержимого наружу. Исследование было проведено в диапазоне температур от 22 до 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), с повторяемостью пяти раз на каждой температуре, значение pH от 5,4–5,6. Для моделирования взаимосвязи между скоростью гибели клеточного биосенсора и температурой использована аррениусовская координата ($\ln k - 1/T$) (Рисунок 9).

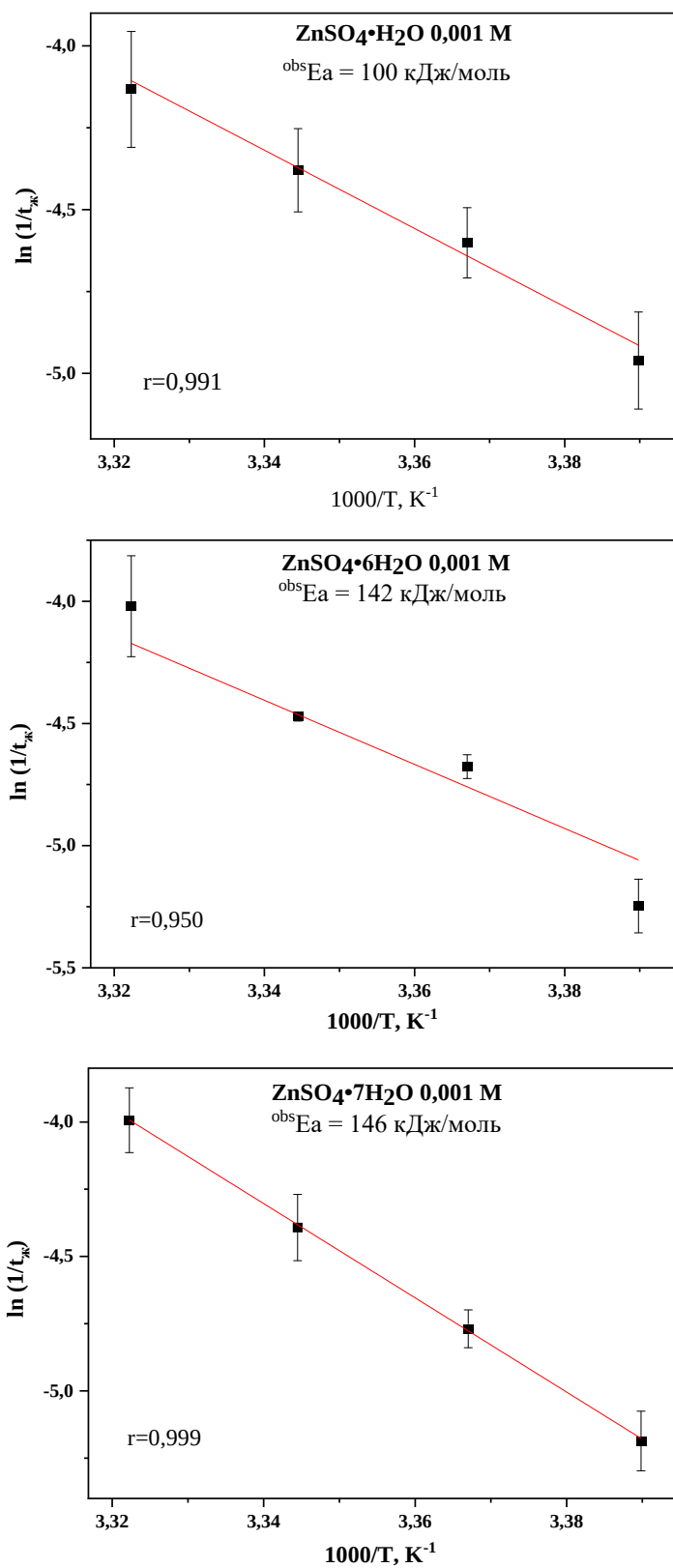


Рисунок 9. Зависимость скорости гибели *Sp. ambigua* на аррениусовских координатах от температуры (среднее±SD, n=5)

Значение кажущейся энергии активации рассчитывало по уравнении Аррениуса. В биологии гибель клетки не является единичной химической реакцией, а представляет собой сложную последовательность реакций, включающую разрушение клеточной мембраны, денатурацию белков и другие молекулярные повреждения.

Следовательно, кажущаяся энергия активации ($^{obs}E_a$), рассчитанная экспериментально, отражает не энергию конкретной реакции, а суммарную энергию всех этапов механизма гибели. На основе этого графика определяется значение $^{obs}E_a$, что позволяет оценить чувствительность клеточного биосенсора к температуре и предсказать кинетику процесса гибели.

На рисунке 10 представлено значение энергии активации лиганд-индуцируемой гибели *Sp. ambiguum* в растворах $ZnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

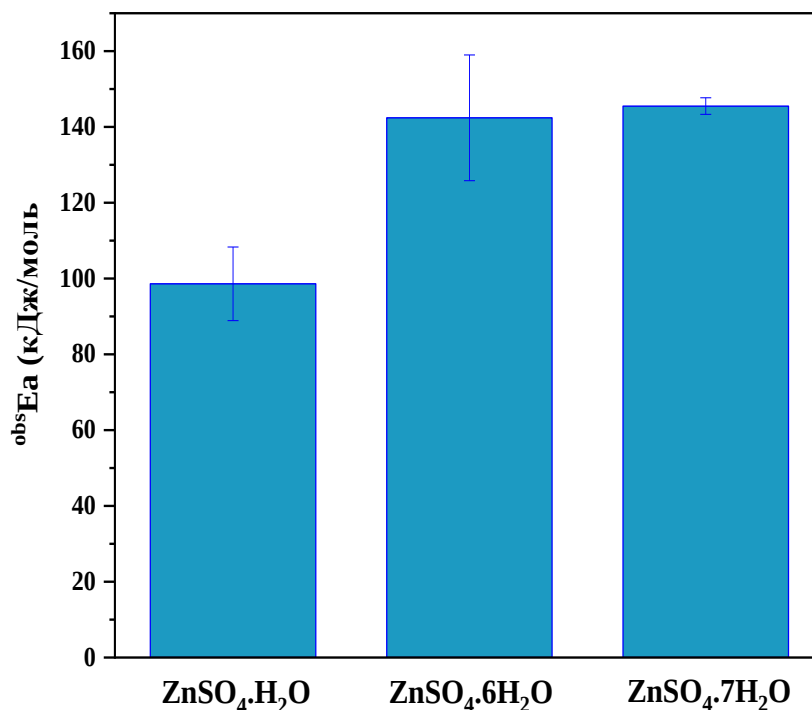


Рисунок 10. Наблюдаемая энергия активации $^{obs}E_a$ лиганд-индуцируемой гибели *Sp. ambiguum* при концентрации 0,001M (среднее $\pm$ SD, n=5)

Из рисунка видно, что наименьшей энергией активации характеризуется раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (100 ± 10 кДж/моль), а остальные растворы $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ обладают эквивалентной биологической активностью с соответствующей энергией активации 142 ± 16 кДж/моль и 146 ± 2 кДж/моль. Полученные результаты позволяют сравнить биологическую активность/токсичность гидратированных форм сульфата цинка. При этом свидетельствует о более высокой биологической активности раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, чем двух других растворов.

При полном растворении различные гидратные формы сульфата цинка образуют один и тот же тип гидратированных ионов. Независимо от того, начинается ли процесс с моногидрата или гекса-, гептагидрата, при полном растворении образуется гидратированный ион $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Однако кинетика процесса различается по скорости и механизму растворения.

Многочисленные предыдущие исследования показали, что энергия активации не зависит от состояния инфузорий, так как она является инвариантным параметром [119, 254]. Это также согласуется с Аррениусовской кинетикой, согласно которой скорость реакции зависит только от энергии активации и температуры. В нашем исследовании мы проанализировали, как продолжительность жизни инфузорий связана с концентрацией цинка в растворе при разных значениях - 0,01 М и 0,001 М. Эксперимент проводился в течение одного дня, чтобы обеспечить одинаковое физиологическое состояние инфузорий на всех этапах тестирования (Рисунок 11).

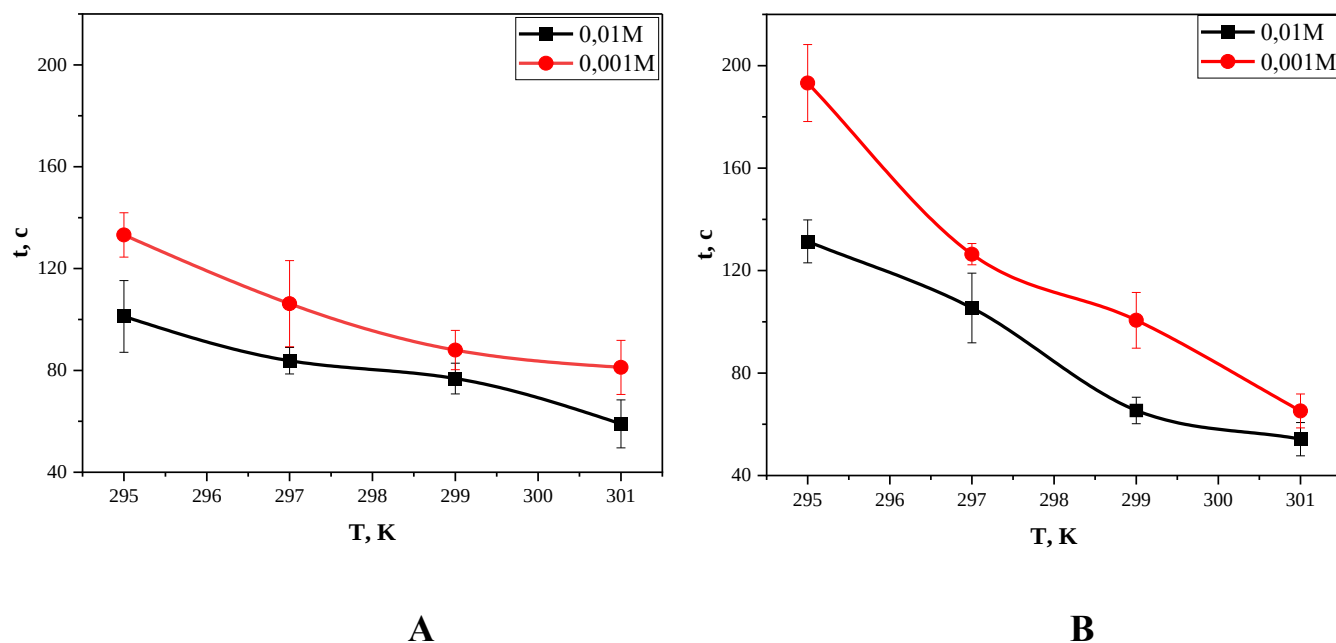


Рисунок 11. Зависимость времени жизни *Sp. ambiguum* от температуры при различных концентрациях цинка в растворе $ZnSO_4 \cdot H_2O$ в прямых координатах (среднее $\pm$ SD, $n=5$), **А**-приготовленные растворы подверглись анализу сразу после приготовления, **В** – анализ растворов через 3 недели.

Из рисунка 11 видно, что уровень смертности *Spirostomum ambiguum* варьируется при разных уровнях концентрации цинка, при концентрации раствора моногидрата сульфата цинка 0,01 М инфузории быстрее погибали, чем при концентрации 0,001 М, что было ожидаемо, но было выполнено для подбора рабочих концентраций.

В исследовании, посвященном оценке влияния времени хранения на биологическую активность цинка сульфата моногидрата, провели анализ кинетики реакции гибели клеток *Spirostomum ambiguum* и представили в виде графика в аррениусовских координатах, значение pH от 5,9–6,0 (Рисунок 12).

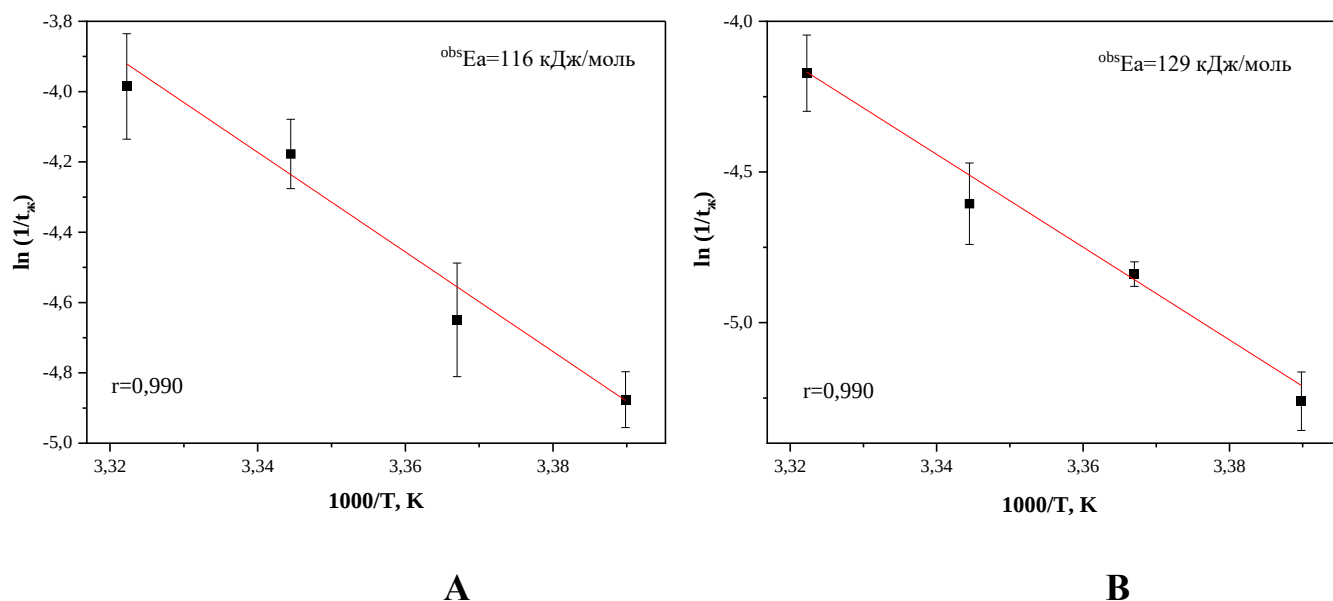


Рисунок 12. Зависимость скорости лиганд-индуцируемой гибели *Sp. ambigua* от температуры при различных концентрациях цинка в растворе $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (среднее $\pm$ SD, $n=5$), **А**-концентрация раствора 0,01 М, **В**- 0,001 М.

Показано из рисунка 12, что $^{obs}E_a$ для обеих концентраций (0,01 М и 0,001 М) через 3 недели значительно увеличилась по сравнению с исходными значениями. Увеличение $^{obs}E_a$ (с 68 кДж/моль до 116 кДж/моль для концентрации 0,01 М и с 100 кДж/моль до 129 кДж/моль для концентрации 0,001 М) отражает снижение биологической активности раствора, проявляющееся в замедленной скорости гибели клеточного биосенсора. Данное явление четко демонстрирует влияние условий окружающей среды (температура, pH, окисление) и времени хранения на химическую стабильность соединения, что приводит к превращению свободных ионов цинка Zn^{2+} в малоактивные формы, такие как осадки или комплексы (например, $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnCO_3).

Особо следует отметить, что *Sp. ambigua* проявил себя как чувствительный биологический индикатор для оценки качества биологических активных соединений с течением времени. Благодаря наблюдению за скоростью сокращений, уровнем гибели и значением $^{obs}E_a$, установили, что данный клеточный биосенсор достоверно

отражает степень снижения биологической активности фармацевтического вещества, даже когда физико-химические изменения трудно обнаружить инструментальными методами фармацевтического анализа. На основе этих результатов предлагается использовать инфузории в качестве простой, экономичной, но эффективной системы для проверки стабильности фармацевтических субстанций после длительного хранения.

Известна возможность корреляции между значениями наблюдаемой энергии активации $^{obs}E_a$ и полуметальной дозы LD_{50} у млекопитающих (крысы) при пероральном приёме [258].

Этот подход основан на механизме лиганд-рецепторного взаимодействия, в котором биологически активные соединения (токсины/фармацевтические субстанции) выступают в роли лигандов, связывающихся со специфическими рецепторами на нативных клеточных структурах. Это активирует реакции, приводящие к гибели клетки (например, разрушение клеточной мембраны, ингибирование ферментов).

Данная корреляция позволяет прогнозировать токсичность фармацевтических веществ посредством измерения энергии активации, вместо проведения прямых испытаний на лабораторных животных. Применяется в разработке лекарственных средств и оценке экологических рисков (например, воздействие фармацевтических субстанций на микроорганизмы).

По данным Европейского химического агентства (ЕCHA) сульфат цинка разной формы обводнения (моногидрат, гексагидрат и гептагидрат) имеет пероральные значения LD_{50} 574 мг/кг, 862 мг/кг и 920 мг/кг соответственно для трех гидратных форм сульфата цинка [259]. При этом обнаружено, что меньшее значение энергии активации свидетельствует о более высокой биологической активности раствора $ZnSO_4 \cdot H_2O$, в сравнении с двумя другими растворами (Рисунок 13). Это доказывает наличие корреляции между значениями наблюдаемой энергии активации $^{obs}E_a$ и полуметальной дозы LD_{50} .

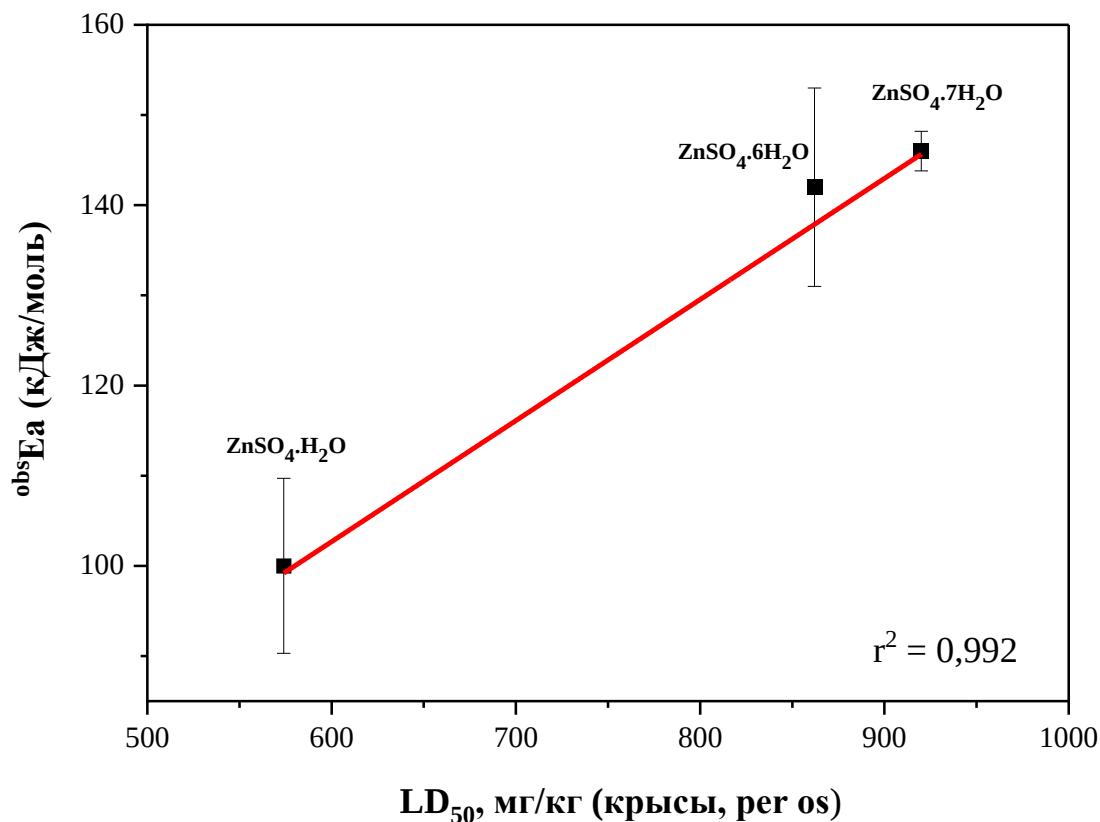


Рисунок 13. Корреляция $^{obs}E_a$ (кДж/моль) гибели *Sp. ambigua* и значений полулетальных доз LD₅₀ у млекопитающих (крыс) при пероральном приёме для субстанций цинка сульфата разной формы обводнения (среднее $\pm$ SD, n=5)

При сравнении с предыдущими результатами исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии (Рисунок 14) обнаружено, что значения кажущейся энергии активации трёх исследуемых растворов имеет корреляцию с LD₅₀ у крыс при пероральном приёме.

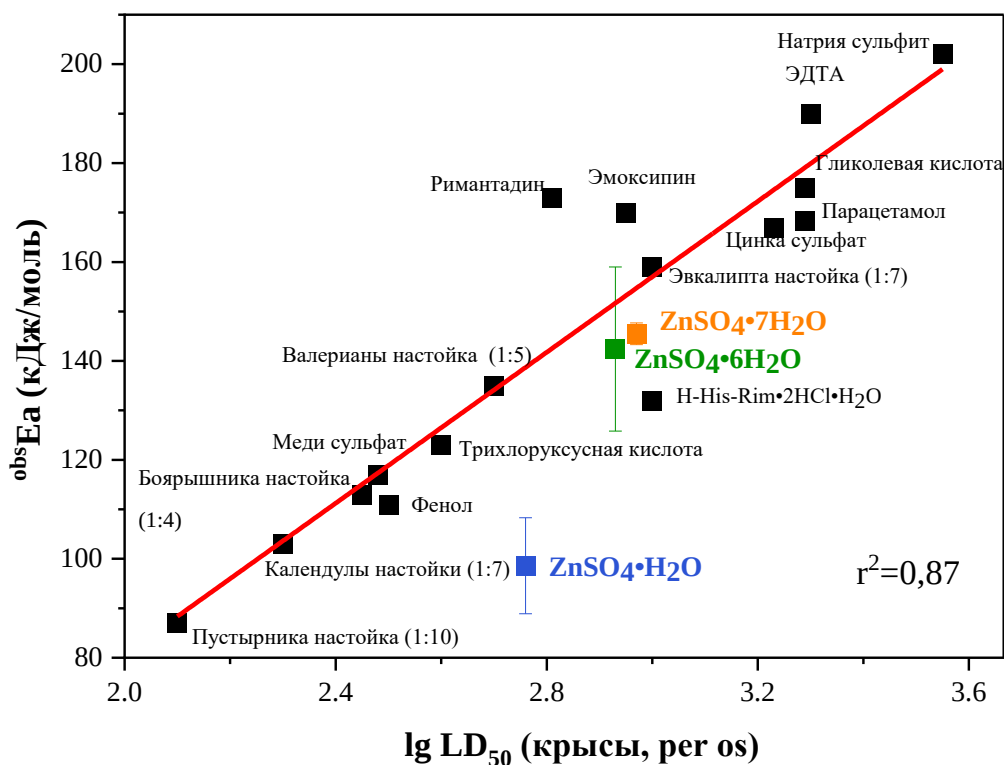


Рисунок 14. Корреляция $^{obs}E_a$ (кДж/моль) гибели *Sp. ambiguum* и полулогарифмических координатах значений полуметальных доз LD_{50} для крысы субстанций для фармацевтического применения

3.3 Изучение влияния фильтрования на энергию активации лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора в растворах сульфата цинка

На рисунке 15 представлено значение наблюдаемой энергии активации лиганд-индуцируемой гибели *Spirostomum ambiguum* в растворах, изготовленных из субстанций $ZnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ при концентрации 0,01M до и после фильтрования. Раствор отфильтрован и оставлен на 3 часа перед проведением эксперимента. Диапазон температуры от 22 до 28°C с испытанием 5 раза (Рисунок 15).

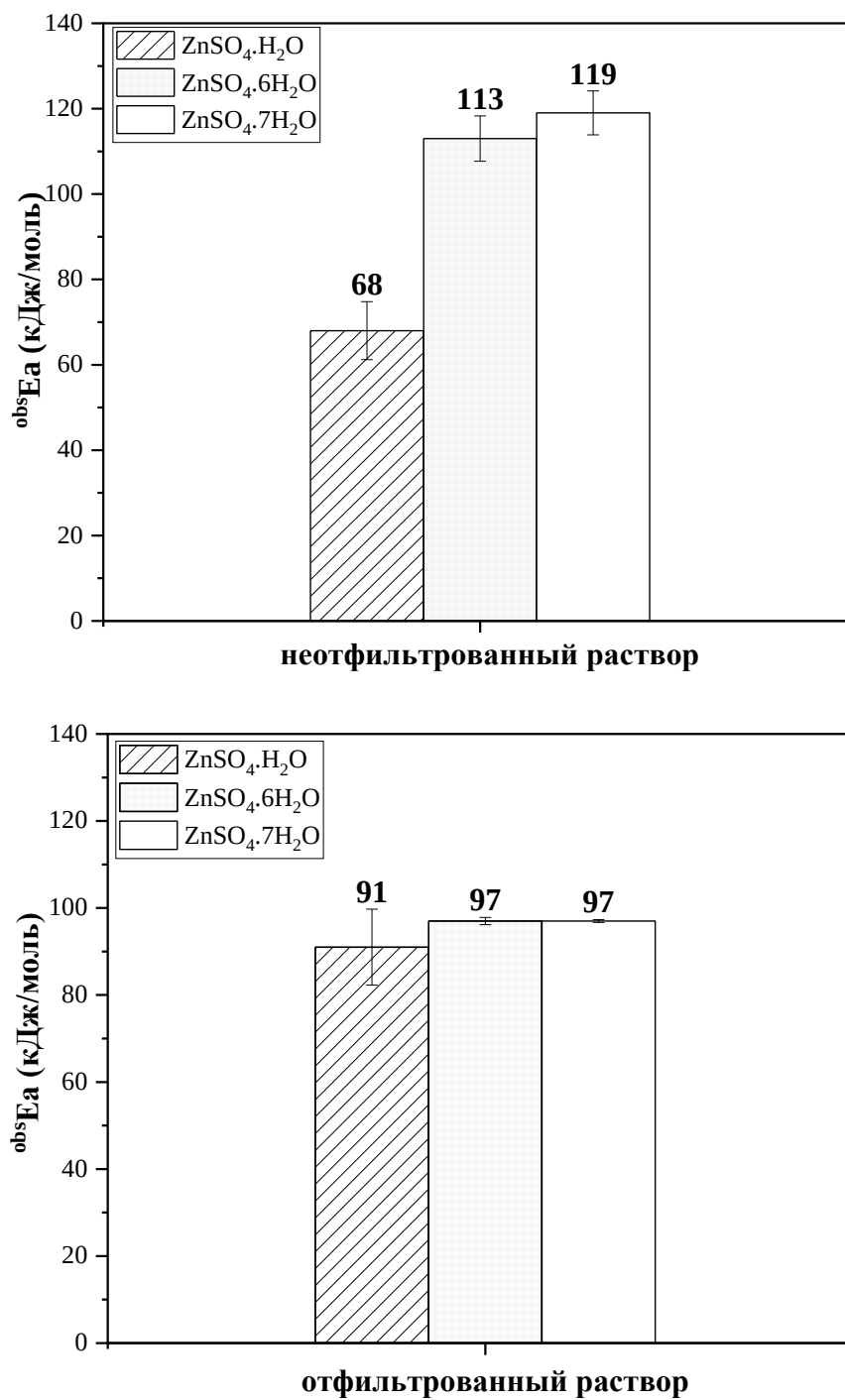


Рисунок 15. Кажущаяся энергия активации гибели *Sp. ambigua* для цинка сульфата при концентрации 0,01 моль/л в зависимости от фильтрования (среднее $\pm$ SD, n=5)

Из рисунка видно, что до фильтрации наименьшей энергией активации характеризуется раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (68 ± 7 кДж/моль, $n=5$), а остальные растворы $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ обладают эквивалентной биологической активностью с соответствующей энергией активации 113 ± 5 кДж/моль ($n=5$) и 119 ± 5 кДж/моль ($n=5$). После фильтрования 3 исследуемые растворы обладают равным значением кажущейся энергии активации.

Раствор не может самостоятельно восстановить исходное состояние после фильтрации несмотря на то, что концентрация цинка в трёх растворах одинакова и не изменяется. Мы предполагаем, что до фильтрования в растворе ионы цинка играют роль кластерного центра, окружённого гидратной оболочкой, что снижает способность цинка к прямому взаимодействию с клетками *Sp. ambigua*. Это требует дополнительной энергии для разрушения физического барьера (гидратной оболочки) и проявления токсичности ионами Zn^{2+} . Однако после фильтрации крупные комплексы разрушаются, высвобождая свободные ионы Zn^{2+} , которые легко взаимодействуют и проникают в клеточный биосенсор, усиливая биологическую активность.

Кроме того, исследование выявило значительные различия в энергии активации между тремя гидратными формами сульфата цинка. Хотя все три формы при растворении в воде преобразуются в аналогичные гидраты, скорость растворения и механизм высвобождения ионов различаются из-за особенностей кристаллической структуры.

Моногидрат сульфата цинка, содержащий только одну молекулу воды в кристаллической форме, растворяется быстро и мгновенно высвобождает ионы цинка. Это ограничивает формирование толстой гидратной оболочки, позволяя ионам цинка напрямую взаимодействовать с инфузориями, что приводит к более высокой токсичности.

Напротив, гексагидрат и гептагидрат сульфата цинка, содержащие больше молекул воды в структуре, растворяются медленнее, постепенно высвобождая ионы цинка. Этот механизм способствует формированию толстой гидратной оболочки, которая действует как барьер, снижая скорость проникновения ионов в клетку.

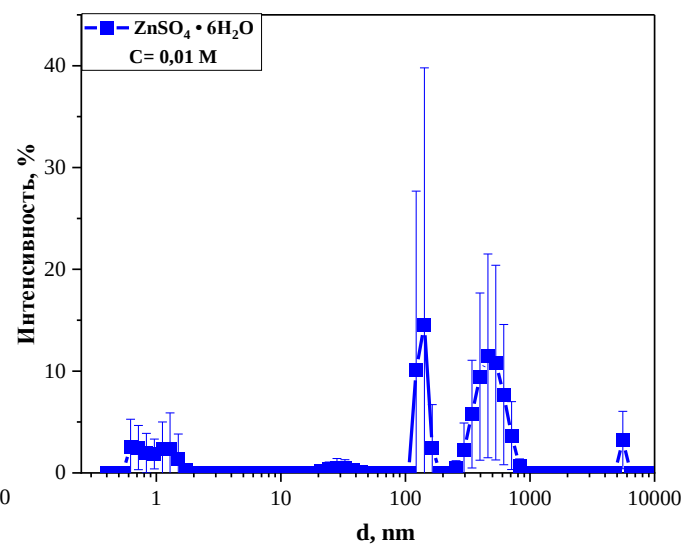
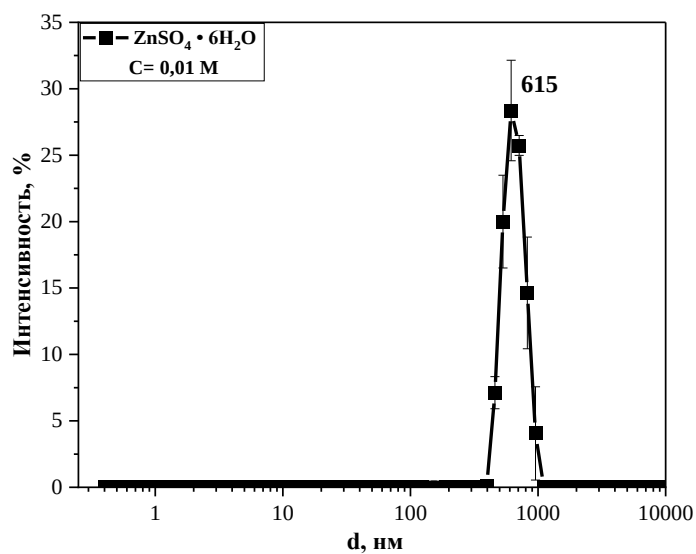
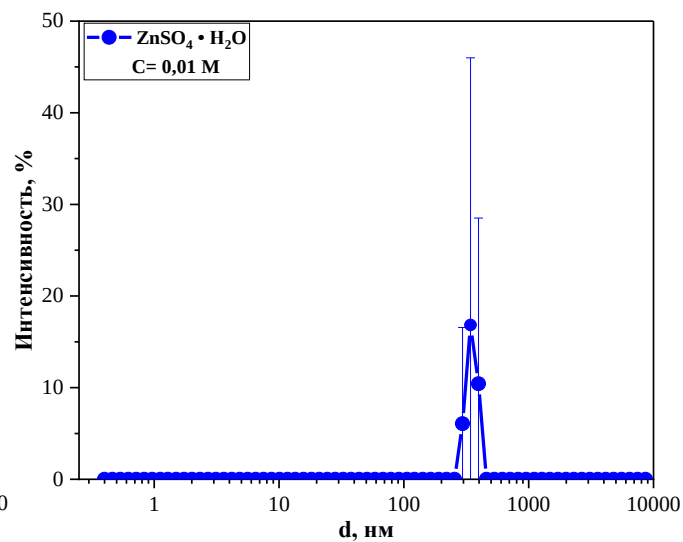
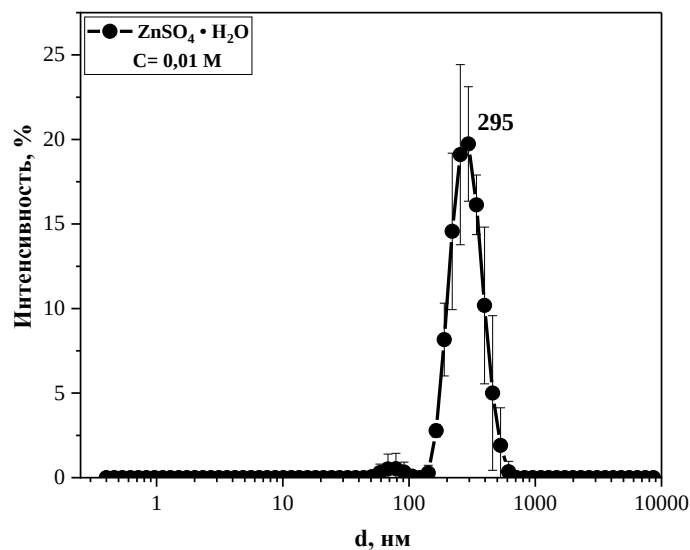
Результаты анализа размеров кластеров в нанометрах (представлено далее) подтверждают, что в растворе моногидрата сульфата цинка наблюдается наименьший размер кластеров (293 нм) по сравнению с гекса- и гептагидратами сульфата цинка, что отражает быстрое высвобождение ионов и ограниченное образование крупных кластеров. Наше исследование подчёркивает тесную связь между структурой фармацевтических веществ и их биологической активностью, а также важность выбора подходящей гидратной формы при изучении токсичности и практическом применении.

Таким образом, субмикронное фильтрование разрушает данные неоднородности и нами было выявлено, что растворы до фильтрования сохраняли свою историю пробоподготовки, несмотря на одинаковые концентрации и аналогичный метод приготовления растворов [260]. Размер кластеров цинка в водном растворе является фактором, влияющим на биологическую активность.

3.4 Измерение дисперсных параметров растворов фармацевтических субстанций с помощью методов DLS и LALLS

Несмотря на то, что концентрации анализируемых растворов были одинаковыми, можно обнаружить различия в токсичности трех растворов гидратированного сульфата цинка. Поэтому был проведен анализ методом динамического и малоуглового рассеяния света для определения размера частиц в нанометровом и микрометровом диапазонах, а также показано их распределение в водном растворе. На рисунке 16 и 17 представлены полученные распределения частиц по размерам в

диапазоне нанометров, а на рисунке 18 в микрометровом диапазоне до и после фильтрования.



A

B

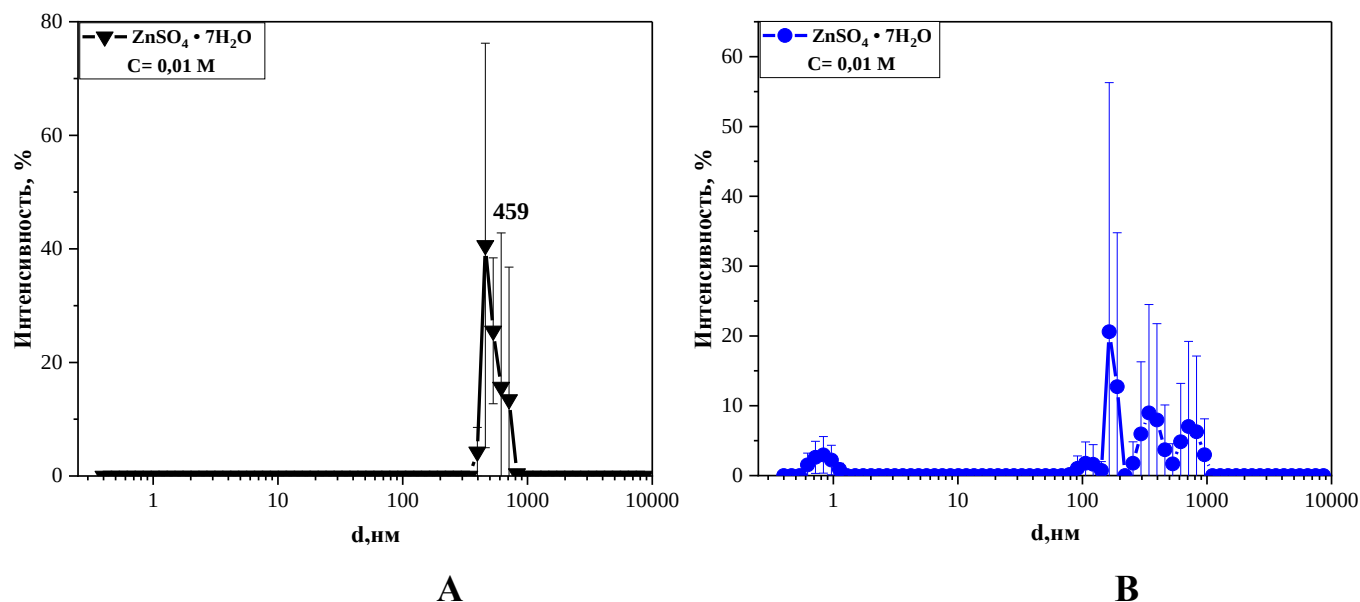
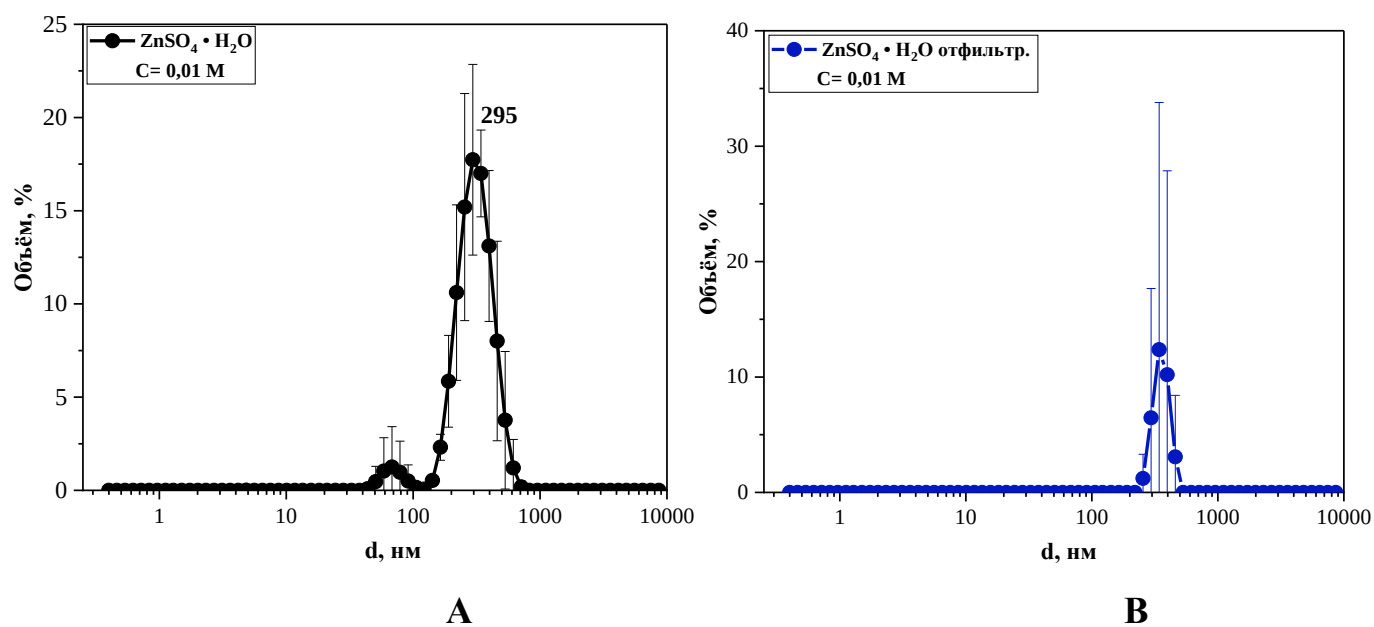


Рисунок 16. Распределение частиц дисперсной фазы по интенсивности в растворе сульфата цинка моно-, гекса- и гептагидрата. **А** – раствор до процесса фильтрования; **В** – раствор, после фильтрования через субмикронный фильтр (среднее $\pm$ SD, n=5)



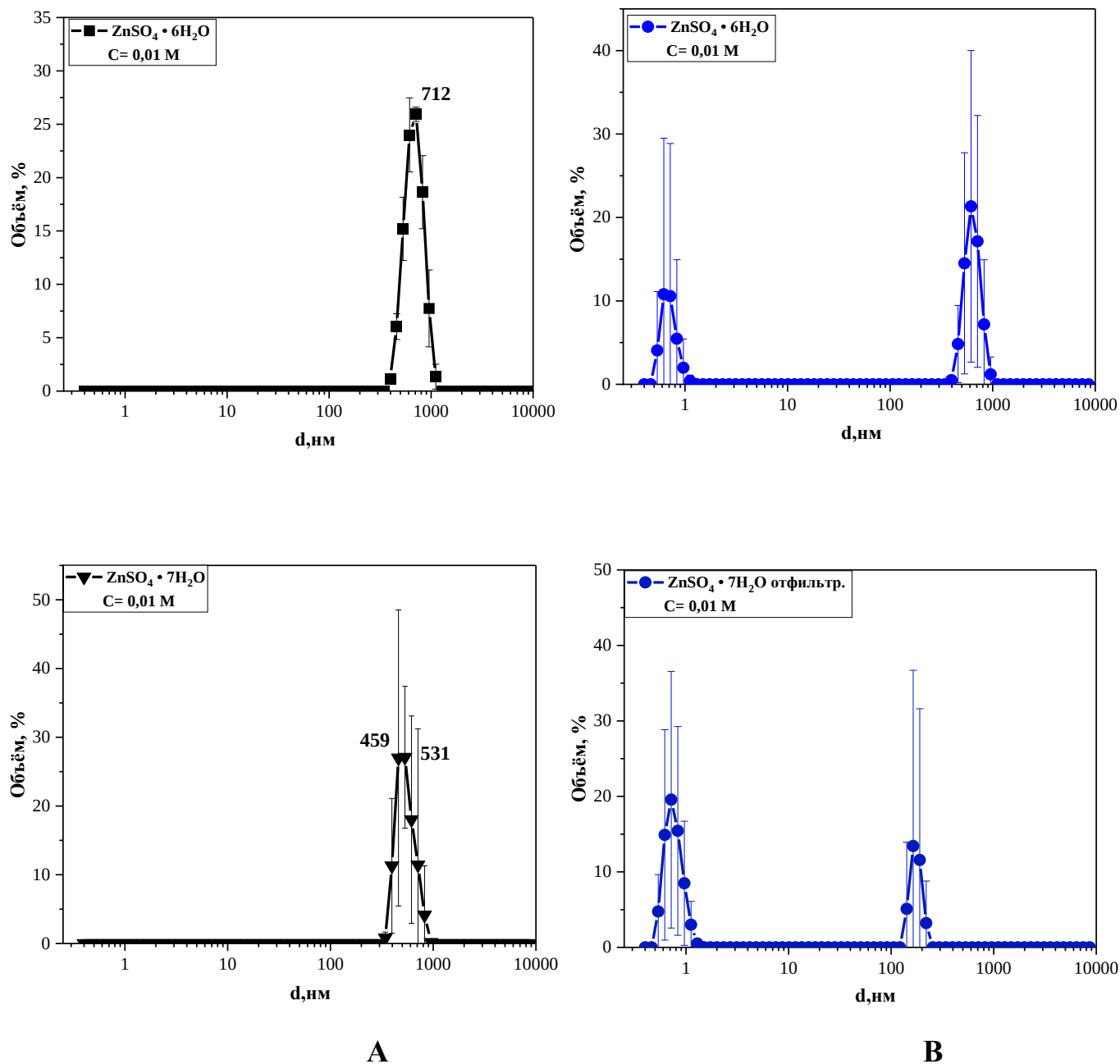


Рисунок 17. Распределение частиц дисперсной фазы по объёму в растворе сульфата цинка моно-, гекса- и гептагидрата. **А** – раствор до процесса фильтрования; **В** – раствор, после фильтрования через субмикронный фильтр (среднее $\pm$ SD, n=5)

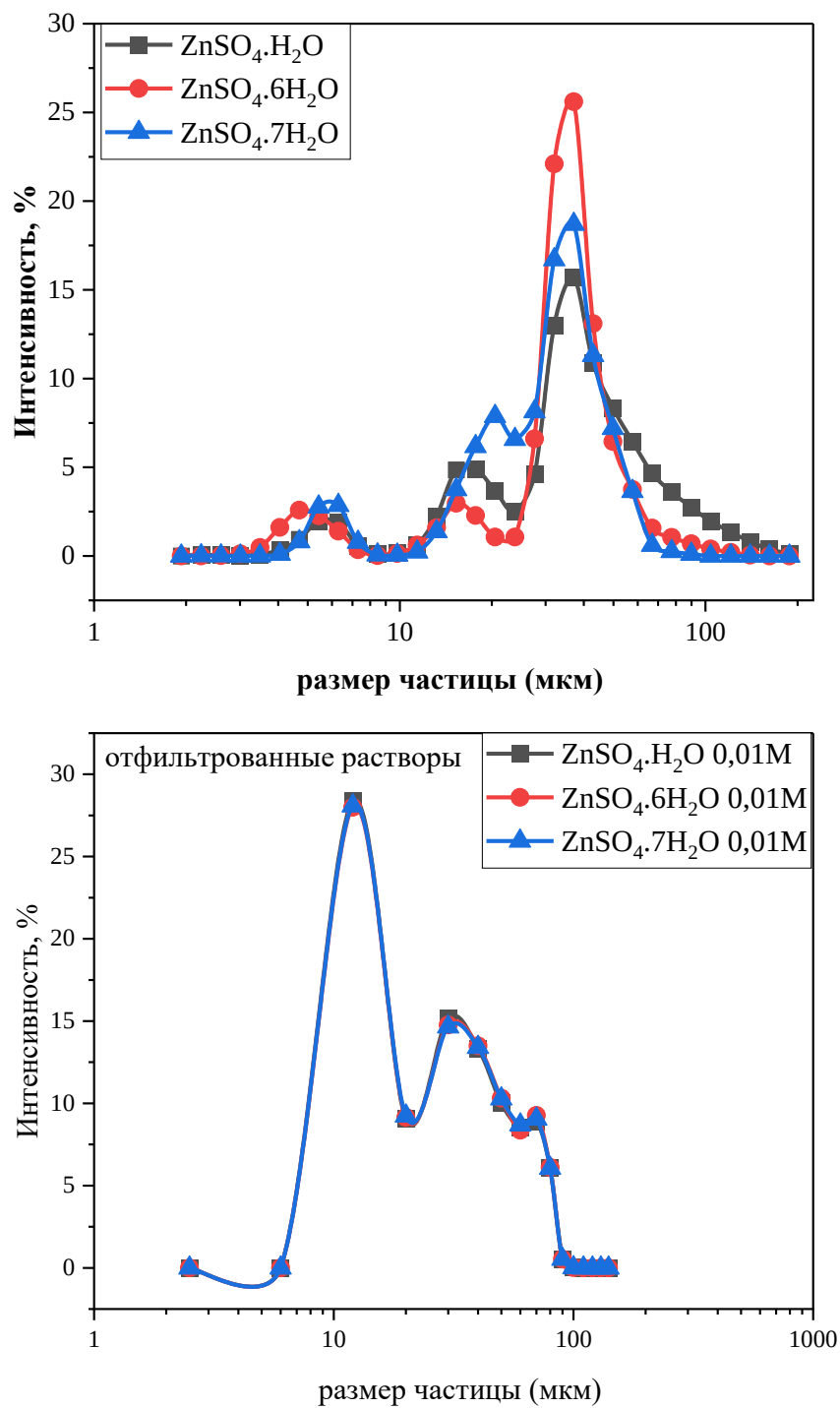


Рисунок 18. Объемное распределение частиц дисперсных растворов сульфата цинка разной формы обводнения до и после фильтрования

На рисунках 16 и 17 видно, что существует разница в размерах частиц в растворах сульфата цинка разной формы обводнения по интенсивности и по объёму. До фильтрации наблюдались моодисперсная полоса распределения частиц с размером 295 нм по объёму для раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, для раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 712 нм, для раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 531 нм. После фильтрации в диапазоне измерения размеров частиц от 0,1 до 1000 нм практически не наблюдались частицы.

Различия в размерах частиц в растворе до фильтрации указывают на образование кластеров. Предполагается, что в таких кластерах цинк выступает в роли кластерного центра, связанного с окружающими молекулами воды через различное координационное число (обычно от 4 до 6 в первой гидратной оболочке). Это приводит к разным размерам кластеров в гидратированных молекулах сульфата цинка. Субмикронный фильтр разрушает эту структуру и оставляет в растворе свободную форму иона Zn^{2+} .

Однако после фильтрации через мембрану с размером пор 0,22 мкм исследуемые растворы выдерживали в течение 3 часов до проведения анализа методом LALLS и были обнаружены в системе частицы микрометрового диапазона (Таблица 7).

Таблица 7. Размер частиц дисперсных растворов сульфата цинка разной формы обводнения до и после фильтрования (мкм)

Образец	Размер частиц (мкм)	
	До фильтрования	После фильтрования
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	37	12
$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	37	12
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	12

Это свидетельствует либо о регенерации кластера в ходе выдержки, либо такие кластеры уже существовали в исходном растворе, но не обнаружались методом DLS из-за аппаратных ограничений методики (диапазон измерения: 1 нм - 10 мкм).

3.5 Определение влияния pH на токсичность растворов сульфата цинка моно- и гептагидрата на основе метода Spirotox

Государственная фармакопея РФ (XV) и Европейская фармакопея X регламентирует значение pH 4,0–5,6 для раствора сульфата цинка моногидрата (0,28 моль/л) и 4,4–5,6 для раствора сульфата цинка гептагидрата и гексагидрата (0,19 моль/л) [261]. Процедура количественного определения сухого остатка фармацевтических субстанций в процессе сушки соответствует ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» [262].

Экспериментальные этапы проводились следующим образом: использовали предварительно высушенную керамическую чашку ($105 \pm 20^\circ\text{C}$) и взвешивали до постоянной массы (погрешность $\leq 0,0001$ г); собирали данные о массе каждые 60 минут сушки, используя стандартную процедуру охлаждения (30 минут в эксикаторе).

Формула для определения процентной потери массы:

$$W = \frac{(m_2 - m_3) \cdot 100\%}{m_2 - m_1} \quad (11)$$

где m_1 – постоянная масса чашки (г); m_2 – масса чашки с исследуемыми фармацевтическими субстанциями перед сушкой (г); m_3 – масса мерного стакана с испытуемым образцом после сушки (г).

После трехкратного высушивания фармацевтических субстанций в течение 3 часов в соответствии с указаниями Российской Фармакопеи измеряли pH при различных концентрациях. Приготовленные растворы подверглись анализу сразу

после приготовления, а затем через 18 и 53 дня. Результаты показывают, что существует зависимость рН от концентрации изучаемых растворов (Рисунок 19).

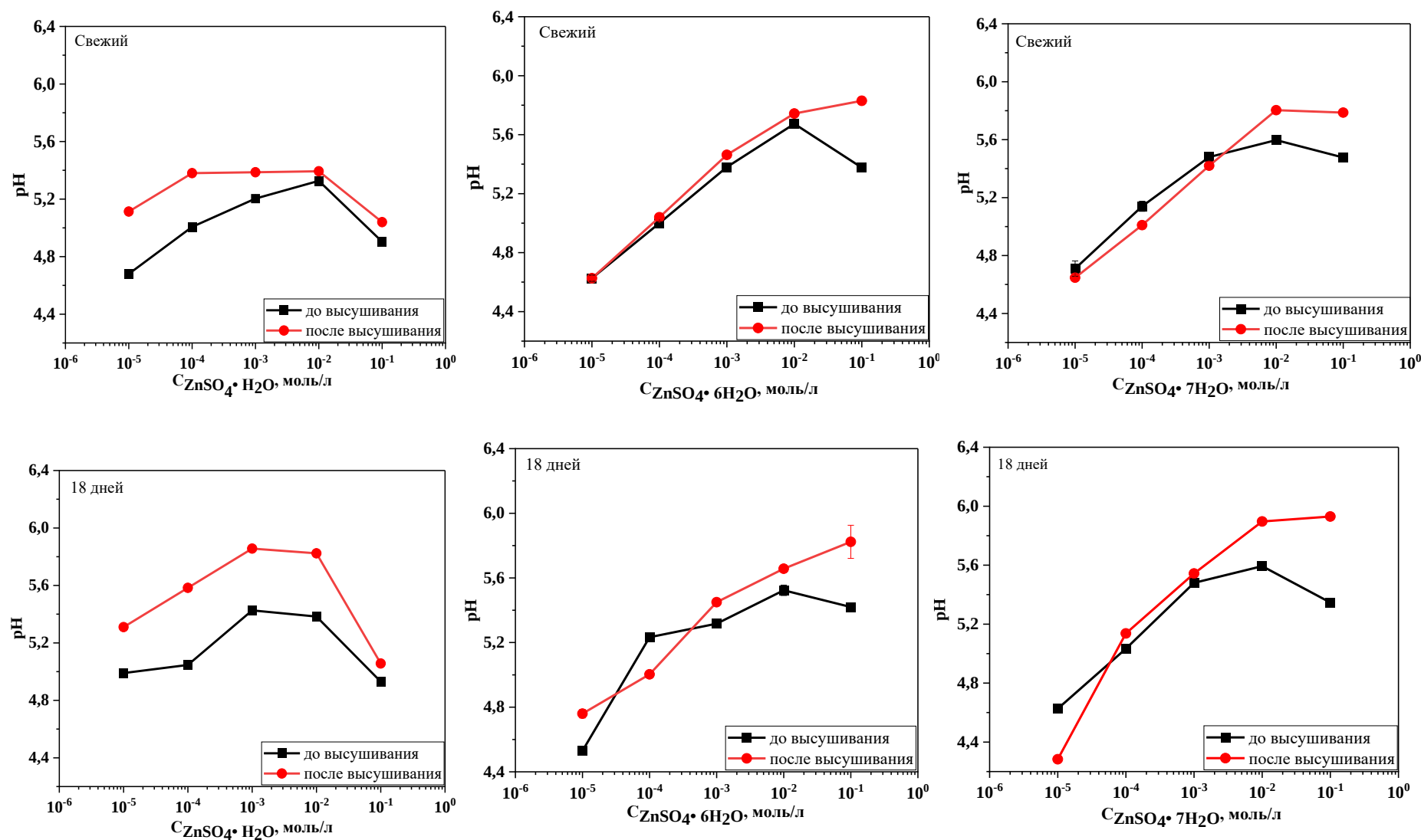


Рисунок 19. Зависимость значения pH от концентрации раствора сульфата цинка моно- и гекса- и гептагидрата до и после высушивания (среднее $\pm$ SD, n=3)

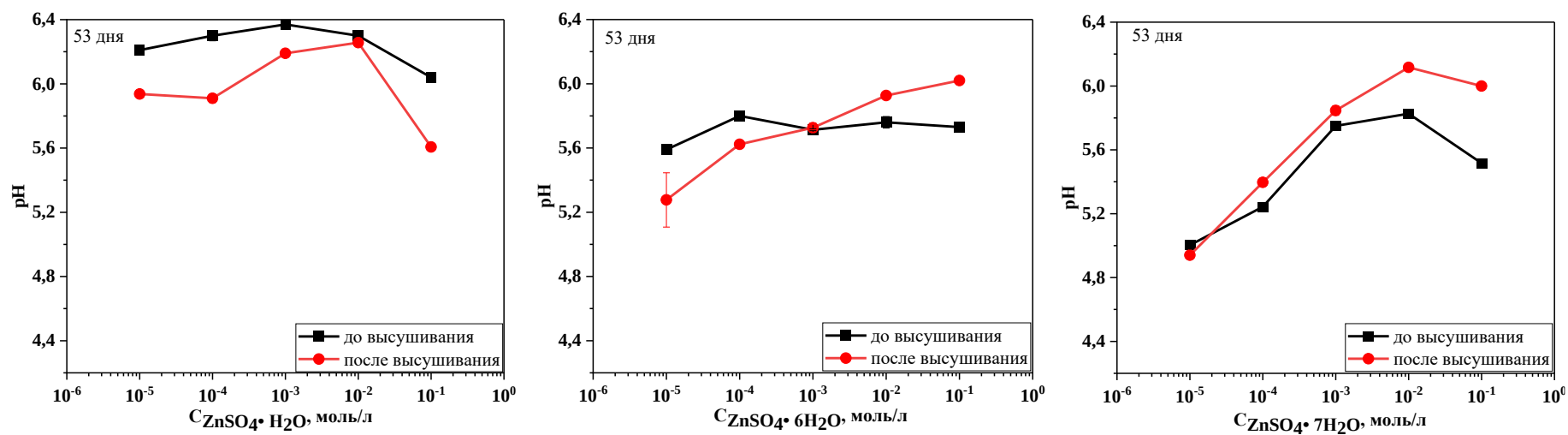
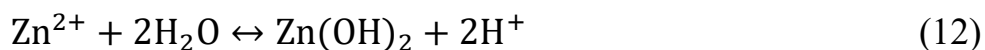


Рисунок 19 (продолжение). Зависимость значения pH от концентрации раствора сульфата цинка моно-, гекса- и гептагидрата до и после высушивания (среднее $\pm$ SD, $n=3$)

В целом все графики имеют тенденцию к параболическому пику при концентрации 0,01 М, поэтому мы провели эксперименты с растворами в трех концентрациях: 0,1 М, 0,01М и 0,001М для научной работы диссертации. При концентрации 0,1 М мы обнаружили, что инфузории погибают очень быстро (от 22 до 28°C). Время гибели составляет всего несколько секунд. Мы предполагаем, что концентрации 0,01 М является самым оптимальным значением для эксперимента растворов сульфата цинка разной формы обводнения.

В большинстве растворов, представленных на Рисунке 19, наблюдали, что растворы, приготовленные из фармацевтических субстанций после высушивания, имеют более высокое значение pH по сравнению с их исходными гидратированными формами. Это явление можно объяснить процессом удаления кристаллизационной воды из начальной структуры при высушивании, что приводит к образованию безводной формы соли с меньшей растворимостью.

При растворении безводная соль высвобождает меньше ионов цинка в раствор, чем гидратированная форма. Снижение концентрации цинка ограничивает процесс гидролиза ионов металла в воде, что описывается уравнением:



Уменьшение концентрации Zn^{2+} снижает количество образующихся ионов H^+ , что приводит к повышению значения pH раствора. Данный результат согласуется с прямой взаимосвязью между растворимостью соли, концентрацией свободных ионов металла и кислотностью системы.

При увеличении значения pH до нейтрального значения кажущаяся энергия активации $^{\text{obs}}E_a$ постепенно снижается от 142 до 65 кДж/моль для раствора гептагидрата сульфата цинка, и с 112 до 65 кДж/моль для моногидрата сульфата цинка, что говорит о повышении токсичности среды для инфузории *Sp. ambiguum*. Изучаемый диапазон pH поддерживался ниже 6,5, чтобы избежать осаждения гидроксидов металлов. Это исследование не является клинически сравнительным по

своей природе, а фокусируется на подтверждении, что метод Spirotox эффективен для определения взаимосвязи токсичности с pH (Рисунок 20).

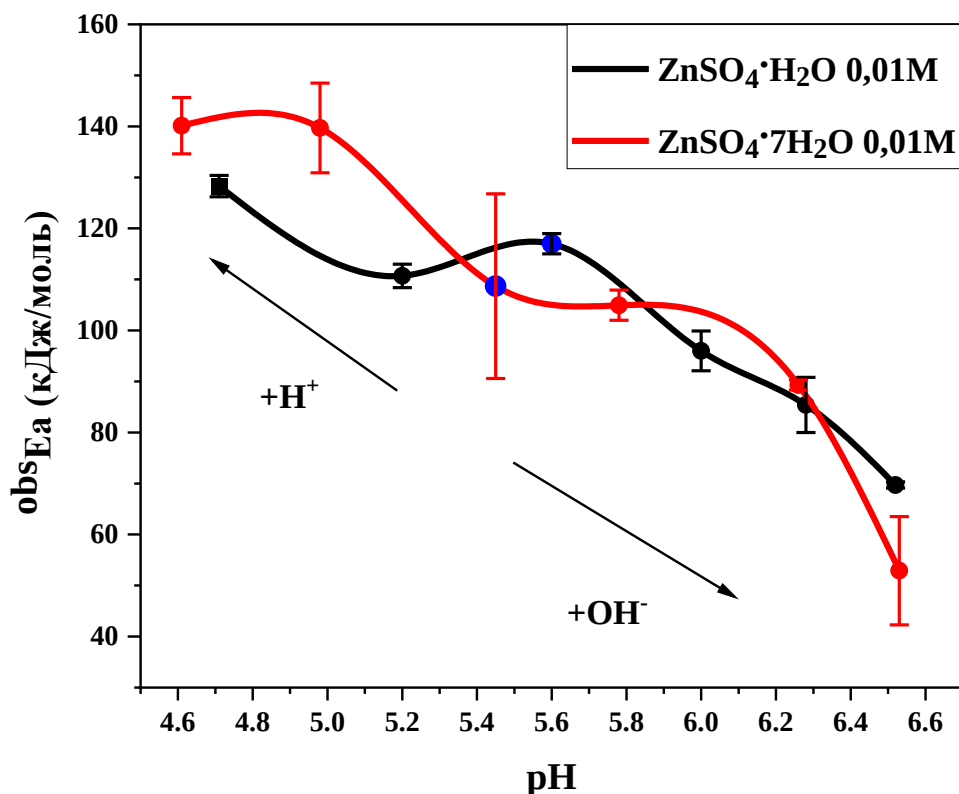


Рисунок 20. Зависимость $^{obs}E_a$ лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора от значения pH раствора сульфата цинка гептагидрата и моногидрата (среднее $\pm$ SD, n=5)

Чтобы выяснить разницу во времени выживания инфузорий при разных значениях pH, эксперименты проводились для раствора $ZnSO_4 \cdot H_2O$ и $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01M при двух уровнях pH 5,0 и 6,5. На рисунке 20 видно, что при увеличении pH от 5,0 до 6,5 время жизни *Sp. ambigua* уменьшается для двух исследуемых растворов (при температуре 297 К с 118 секунд до 67 секунд для раствора моногидрата сульфата цинка, и с 154 секунд до 65 секунд для гептагидрата сульфата цинка). Показано, что

при одной и той же дозировке цинка по мере повышения pH время жизни инфузорий постепенно уменьшалось (Рисунок 21).

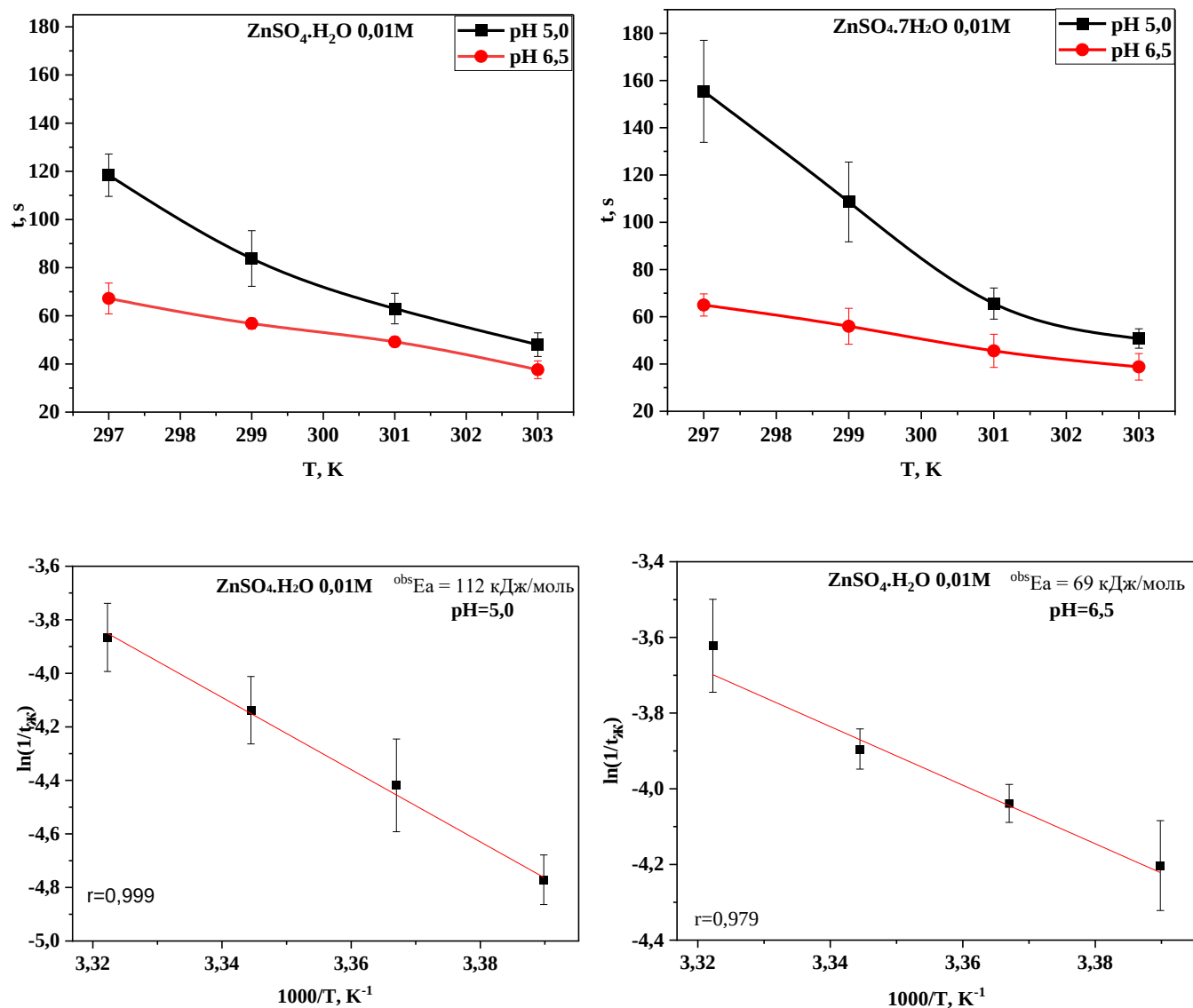


Рисунок 21. Зависимость времени выживания *Spirostomum ambiguum* от температуры при pH = 5,0 и 6,5 в растворе $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01M в прямых и аррениусовских координатах (среднее $\pm$ SD, n=5)

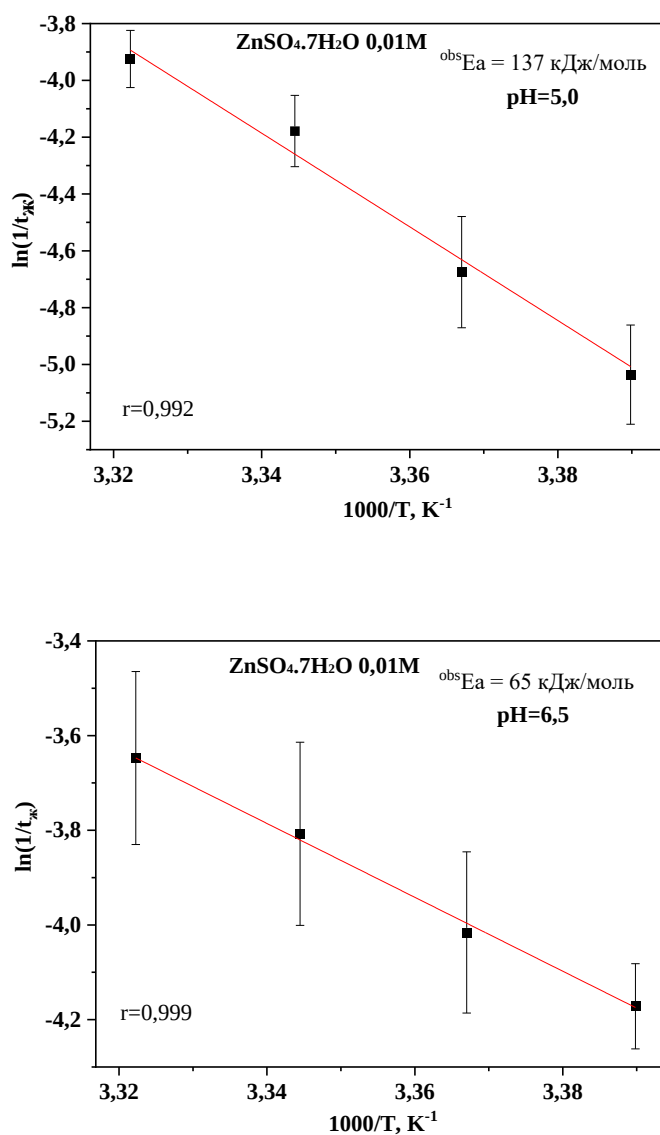


Рисунок 21 (продолжение). Зависимость времени выживания *Spirostomum ambiguum* от температуры при pH = 5,0 и 6,5 в растворе $ZnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01M в прямых и аррениусовских координатах (среднее $\pm$ SD, n=5)

Однако можно заметить, что при 303K время жизни инфузорий в обоих случаях (pH = 5,0 и 6,5) одинаково, поскольку в этом случае на гибель инфузорий влияет не только pH, но и температура.

Мы полагаем, что повышение значения pH в растворе (сопровожающееся снижением концентрации ионов водорода) уменьшает конкуренцию между ионами цинка и водорода на поверхности клеток инфузорий, что, в свою очередь, увеличивает аффинность связывания Zn^{2+} с клеточными мембранными рецепторами.

Одновременно, снижение концентрации H^+ способствует повышению проницаемости клеточной мембраны из-за изменения градиента концентрации, что приводит к нарушению ионного баланса внутри клетки и ускорению процесса её гибели. Результаты наблюдений на *Spirostomum ambiguum* показали явление набухания клеток с резким увеличением их размера – характерный признак нарушения осмотического давления и разрыва клеточной мембраны (Рисунок 22).

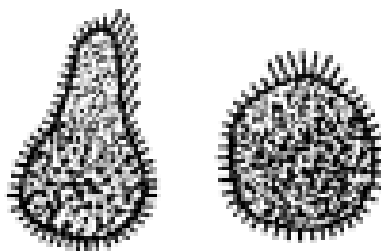


Рисунок 22. Состояние гибели *Sp. ambiguum* при увеличении значения pH до 8

Контрольный раствор NaCl 0,01 моль/л при трех значениях pH = 5,0; 5,8; 6,5 был использован для оценки влияния pH на инфузории. Мы не наблюдали гибели инфузорий в течение более 30 минут при всех трех различных значениях pH. Это связано с ионной силой (I) двух растворов, а также отражает специфические химические свойства иона цинка. Формула впервые была выведена Льюисом с ассистентом М. Рендаллом [263]:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i \times Z_i^2 \quad (12)$$

где C_i — молярные концентрации отдельных ионов (моль/л),

Z_i - заряды ионов

NaCl 0,01 M: $I = [0,01 \cdot (+1)^2 + 0,01 \cdot (-1)^2]: 2 = 0,01 \text{ M}$.

ZnSO₄ 0,01 M: $I = [0,01 \cdot (+2)^2 + 0,01 \cdot (-2)^2]: 2 = 0,04 \text{ M}$

Ионная сила раствора сульфата цинка в четыре раза превышает ионную силу раствора хлорида натрия при одинаковой молярной концентрации. Это показывает, что ионы цинка вызывают нарушение водного и ионного баланса в клетках, что приводит к разрыву клеток.

Увеличение токсичности раствора сульфата цинка гидрата при pH 6,5 не противоречит инертности NaCl в тех же условиях, поскольку токсичность тяжёлых металлов зависит от специфических химических форм (комплексы и кластеры) и механизмов биологического взаимодействия, а не только от значения pH или концентрации свободных ионов. В отличие от цинка ионы Na⁺/Cl⁻ не способны образовывать сложные комплексы и сильно связываться с биологическими функциональными группами.

Таким образом, Spirotox-тест эффективен для изучения взаимодействия pH и токсичности металлов, но неприменим для систем с единственным фактором (например, NaCl). Данный результат подчёркивает важность учёта физико-химических свойств металлов и физиологических реакций клетки при оценке токсичности, а не только концентрации отдельных ионов.

3.6 Применение метода Spirotox для определения биологической активности в двухкомпонентных растворах, содержащих соли цинка и магния

По данным литературы цинк и магний являются важными металлами, входящими в структуру многих ферментов в организме. Недостаток или избыток одного из этих элементов может привести к дисбалансу концентрации другого металла, что, в свою очередь, влияет на активность ферментов. Spirotox-тест также

продемонстрировал эффективность при определении токсичности многокомпонентных растворов.

Эксперименты были проведены с раствором моногидрата сульфата цинка и хлорида магния (отношение 1:1) при концентрации 0,01 М и 0,001 М с повторяемостью $n=5$ при температуре от 24 – 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) и значении pH от 5,9–6,1. Зависимость скорости гибели инфузорий представлена на рисунке 23.

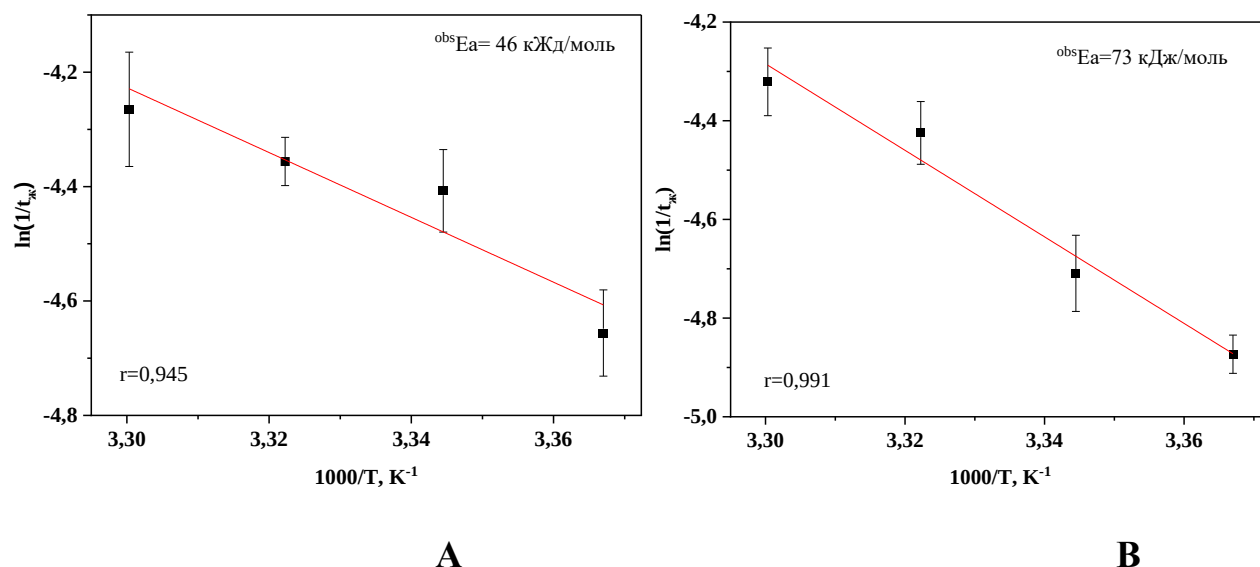


Рисунок 23. Зависимость скорости гибели *Sp. ambigua* при комбинировании раствора $\text{MgCl}_2 + \text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:1) от температуры в аррениусовских координатах (среднее $\pm$ SD, $n=3$). **А**-концентрация раствора 0,01 М; **В**-концентрация раствора 0,001 М

Видно, что существует разница между временем жизни инфузорий при двух различных концентрациях. На рисунке 24 представлено значение энергии активации индуцируемой гибели клеточного биосенсора при комбинированном действии раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и MgCl_2 (1:1) с различной концентрацией. Эксперимент проводился трижды, перед проведением эксперимента также проверяли уровень pH (5,8–6,1, $n=3$) (Рисунок 24).

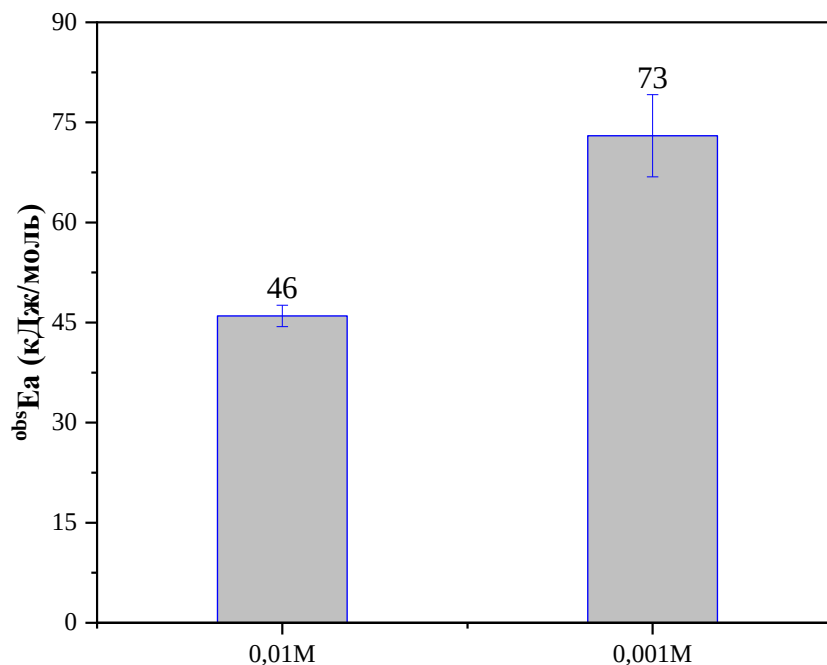


Рисунок 24. Зависимость энергии активации лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора от концентрации (pH=5,8–6,1, n=3)

Полученные значения $^{obs}E_a$ при концентрации 0,01 М 46 ± 2 кДж/моль, а при концентрации 0,001М $^{obs}E_a = 73 \pm 6$ кДж/моль.

В таблице 7 описано, что раствор $MgCl_2$ с концентрацией 0,01–0,001 моль/л не вызывает гибель клеток инфузорий в течение 30 минут при температуре от 22°C до 30°C ($\pm 2^\circ C$). Однако инфузории чувствительны к раствору моногидрата сульфата цинка в концентрации 0,001М с наблюдаемой энергией активации $^{obs}E_a$ 99 ± 10 кДж/моль, а в концентрации 0,01М $^{obs}E_a = 68 \pm 7$ кДж/моль (Таблица 8).

Таблица 8. Энергии активации лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора однокомпонентных и многокомпонентных растворов

	Исследуемые растворы	Энергия активации клеточных переходов ^{obs} E _a кДж/моль
Индивидуальные вещества	MgCl ₂ 0,001M и 0,01M	Не вызывали гибель клетки
	ZnSO ₄ ·H ₂ O 0,001M	99±10
	ZnSO ₄ ·H ₂ O 0,01M	68±7
Комбинация	MgCl ₂ 0,01M + ZnSO ₄ ·H ₂ O 0,01M	43± 3
	MgCl ₂ 0,001M + ZnSO ₄ ·H ₂ O 0,001M	73± 6

Сравнение энергии активации при анализе однокомпонентного и двухкомпонентного раствора свидетельствует о комбинировании двух фармацевтических субстанций (магний и цинк) и показывает более высокую токсичность, чем при проведении эксперимента с отдельными АФИ.

На рисунке 25 также представлено время жизни инфузорий при разных соотношениях Zn:Mg (pH от 5,8 до 6,1). Было отмечено, что инфузории быстро погибали при увеличении содержания цинка и уменьшении содержания магния в растворе (чёрная линия). При снижении содержания цинка и повышении магния инфузории могли жить около 20 минут, прежде чем погибнуть (зелёная линия) (Рисунок 25).

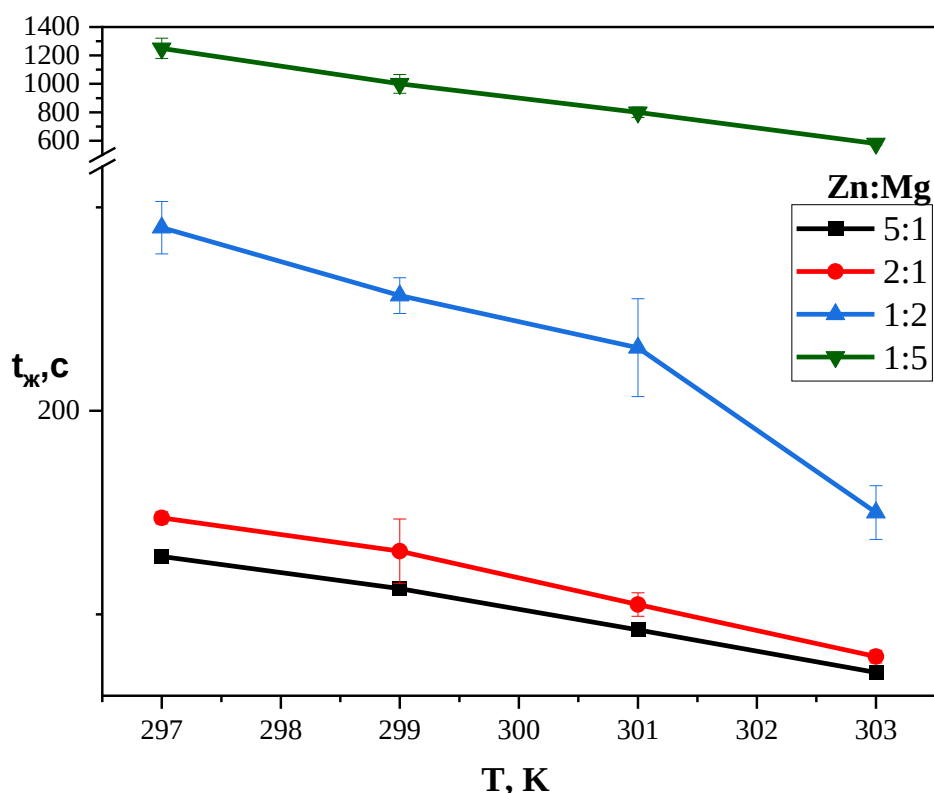


Рисунок 25. Зависимость времени жизни инфузорий от различного отношения Zn:Mg при концентрации исходных растворов 0,001 моль/л. (среднее $\pm$ SD, n=5)

Можно сделать вывод, что по мере снижения содержания цинка и увеличения магния инфузории продолжают быть активными в течение более длительного периода времени по сравнению с периодами, когда уровень цинка повышался, а уровень магния снижался.

В данном исследовании было отмечено, что добавление хлорида магния в раствор моногидрата сульфата цинка усиливает токсичность цинка для простейших *Sr. ambigua*, что выражается в снижении энергии активации. Однако при превышении содержания магния над цинком токсичность цинка снижается, что проявляется в увеличении времени жизни инфузорий. Механизм этого явления объясняется двумя основными факторами: (1) При сбалансированном соотношении (1:1) соль магния повышает проницаемость клеточной мембраны, стимулируя поглощение ионов цинка

внутри клетки, что усиливает токсичность; (2) При избытке соли магния возникает конкуренция за место связывания между Mg и Zn на ионных каналах или транспортных белках мембраны инфузорий, что снижает способность цинка проникать в клетку и, как следствие, ослабляет его токсическое действие. Эти данные отражают синергетическое взаимодействие между двумя металлами Zn и Mg, зависящее от их соотношения.

3.7 Оценка содержания цинка в БАД и ЛП методом РФА, и их биологическая активность с помощью метода Spirotox

Одними из наиболее приоритетных методов контроля качества цинксодержащих биологически активных добавок являются атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) и атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) [264, 265].

Эти методы обладают высокой чувствительностью и превосходной точностью, что позволяет точно количественно определять содержание элементов даже при низких концентрациях. Однако они требуют значительных затрат на оборудование и имеют сложную подготовку проб.

Ключевые преимущества РФА включают неразрушающий анализ, простую подготовку проб и быстрое получение результатов [266]. Однако у этого метода есть некоторые ограничения: неоднородное распределение микроэлементов в исходном образце (без предварительной обработки) может привести к ошибкам количественного определения; спектральные пики с близкой энергией часто перекрываются, особенно при низких концентрациях.

Для оценки содержания цинка в БАД использовали метод РФА. По интенсивности можно было судить о содержании цинка в таблетированных формах.

Кроме цинка, в исследуемых образцах содержатся иные элементы такие, как Fe, Ca, S и др. но в малом количестве (Рисунок 26).

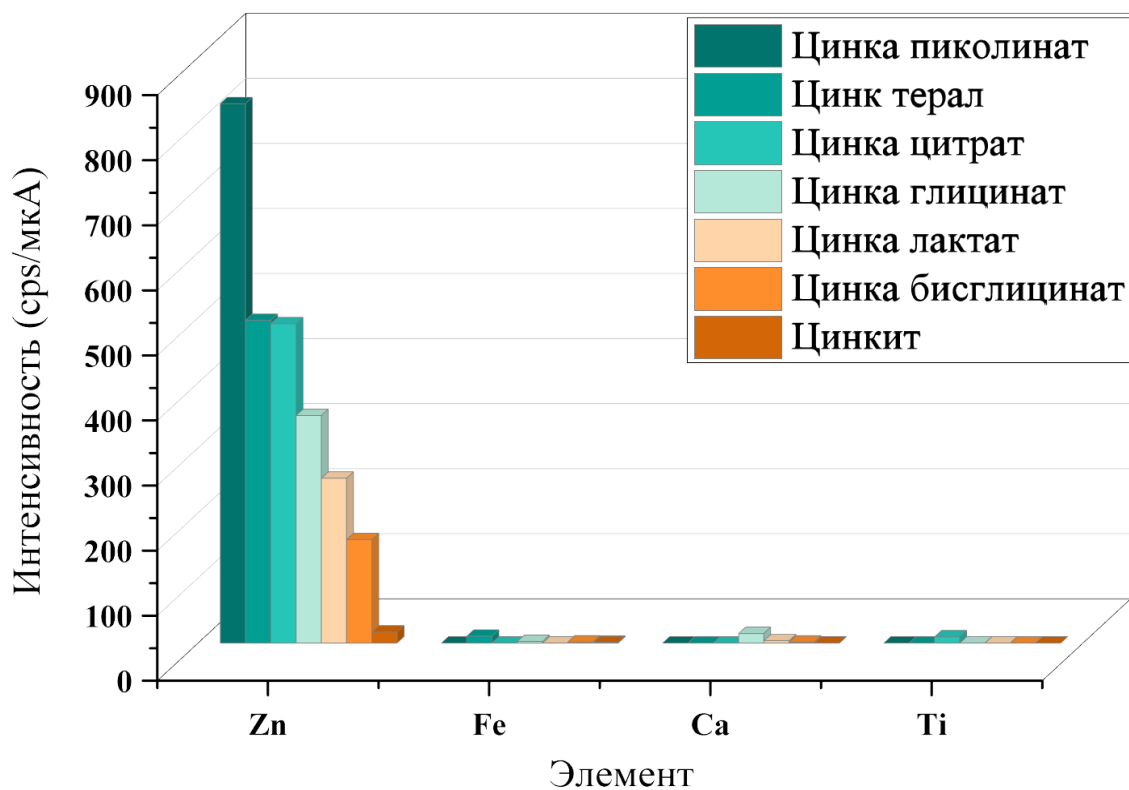


Рисунок 26. Рентгеновская флуоресценция для Zn, Fe, Ca, Ti, содержащихся в цинксодержащих биологически активных добавках

Пересчет количественного содержания цинка в БАДах по разному стандартному материалу представлен в таблице 9.

Таблица 9. Пересчет содержания цинка в БАД по разному стандартному материалу (среднее $\pm$ SD, n=3)

Название БАД	SRM-2976 (%)	Лист Берёзы ЛБ-1 (%)	Элодея канадская ЭК-1 (%)	ПРОИЗВОДИТЕЛЬ (содержание в 1 таблетке, %)
Цинка бисглицинат (БАД)	4,3 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,4	4,5
Цинка лактат (БАД)	6,8 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,3	5,0
Цинка глицинат (БАД)	9,4 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,3	9,6 $\pm$ 0,5	4,7
Цинка цитрат (БАД)	13,6 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 0,7	14,0 $\pm$ 1,0	10,8
Цинка сульфат (Цинкит, БАД)	0,5 $\pm$ 0,2	0,3	0,5 $\pm$ 0,2	0,2
Цинка сульфат моногидрат (Цинктерал, ЛП)	13,3	7,6	13,3	16
Цинка пиколинат (БАД)	22,3 $\pm$ 0,1	12,6 $\pm$ 0,1	22,6 $\pm$ 0,1	8,3

Согласно данным результатов, наблюдается несоответствие между значениями заявленного производителем, и значениями, полученными при расчетах по стандартам,

используемым в этом исследовании. Все результаты действительны на скрининговом и относительном уровне.

Интересно отметить, что содержание цинка в препарате Цинка бисглицинат, рассчитанное по SRM 2796, наиболее близко к значениям, указанным производителем. Особый интерес вызывает тот факт, что наибольшая концентрация цинка была зафиксирована в таблетках Цинка пиколинат при измерении методом РФА. Данное расхождение может быть связано как с особенностями распределения элемента в матрице препарата, так и с повышенной чувствительностью метода РФА к этой форме цинка. Для подтверждения достоверности результатов целесообразно провести дополнительные исследования и увеличить размер выборки. Выявленные расхождения подчеркивают важность стандартизации аналитических методик для биологически активных добавок.

Приготовленные растворы БАД после фильтрования через субмикронный фильтра (0,22 мкм) оценивали на биологическую активность с помощью метода Spirotox (Рисунок 27).

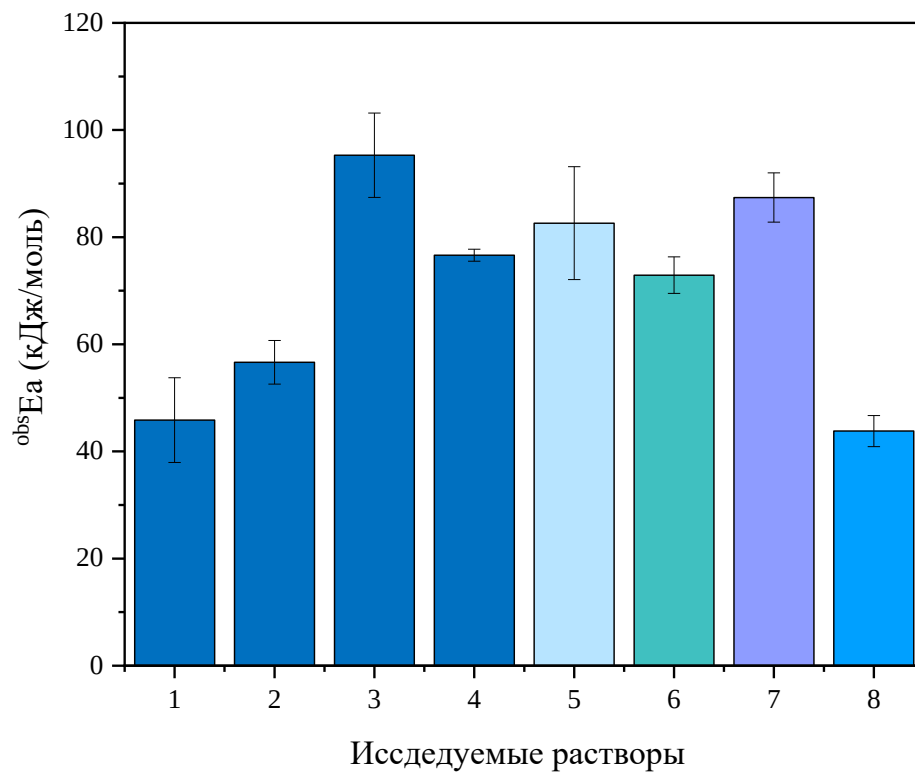


Рисунок 27. Наблюдаемая энергии активации лиганд-индуцируемой гибели инфузории (среднее $\pm$ SD, $n=5$).

1–4. Цинка бисглицинат 0,01 моль/л.

1. Раствор из целой таблетки
2. Раствор 1 через 7 дней
3. Раствор из таблетки без оболочки
4. Раствор из измельченной таблетки
5. Цинка глицинат 0,01 моль/л
6. Цинка цитрат 0,01 моль/л
7. Цинктерал 0,01 моль/л
8. Цинка пиколинат 0,01 моль/л

Из рисунка 27 видно, что растворы имеют разные значения энергии активации даже при одинаковой концентрации. Это говорит о том, что вспомогательные вещества, лекарственная форма цинка и оболочка таблетки могут влиять на биологическую активность при применении к модели Spirotox.

Было отмечено, что раствор, приготовленный из цинка бисглицината с оболочкой, обладает более низкой энергией активации (47 кДж/моль) по сравнению с таблетками, у которых покрытие было удалено механическим воздействием (95 кДж/моль). Это указывает на то, что таблетки без оболочки менее токсичны для инфузорий, чем таблетки с оболочкой.

Примечательно, что в исследованных растворах пиколинат цинка обладает наименьшей энергией активации. Этот результат абсолютно совпадает с результатом РФС анализа, но не соответствует заявленному производителем.

Далее мы также провели эксперименты с лактатом цинка и обнаружили, что инфузории быстро погибают в сильноокислой (в присутствии витамина С) среде (Таблица 10).

Таблица 10. Время жизни инфузории у раствора лактата цинка при разных концентрациях (среднее $\pm$ SD, n=5)

Лактат цинка	0,1 М pH = 3,52	0,05 М pH = 3,59	0,01 М pH = 3,48	0,005 М pH = 4,0
Время жизни инфузории (с) (среднее $\pm$ SD , n=5) T=22°C	Сразу погибли	52 $\pm$ 2	67 $\pm$ 5	120 $\pm$ 15

Аскорбиновая кислота часто добавляется в цинксодержащие биологически активные добавки и способствует разрушению соединений фитатов в цинком, приводящих к увеличению всасывания цинка в организме.

В условиях pH = 4,0 среды, не являющейся оптимальной для *Sp. ambiguum*, раствор с низкой концентрацией лактата цинка (0,005 M) имеет энергию активации в 155 кДж/моль (Рисунок 28).

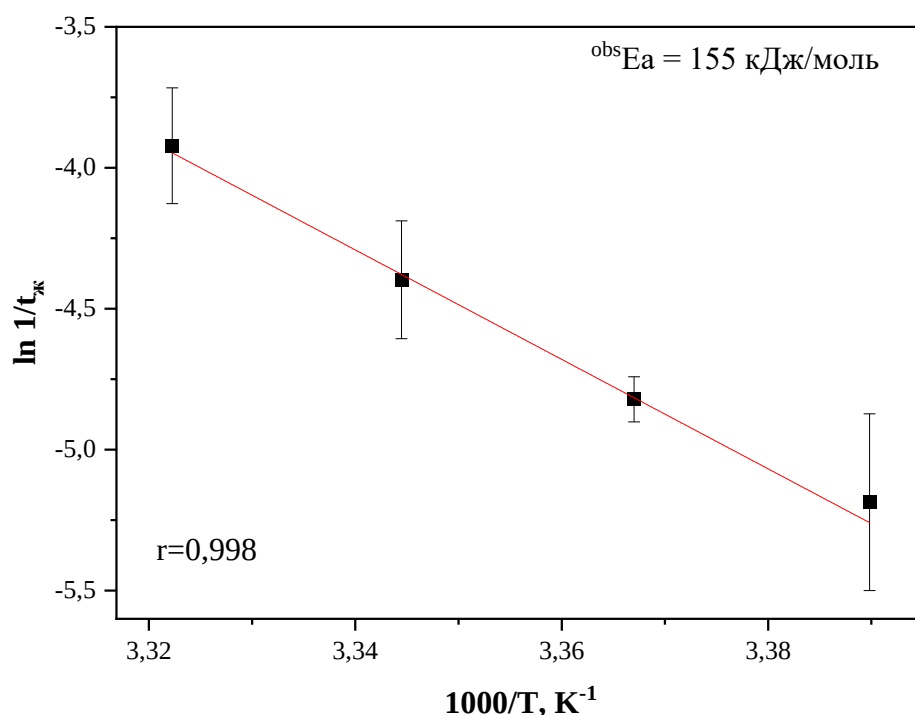


Рисунок 28. Зависимость скорости гибели *Sp. ambiguum* от температуры в аррениусовских координатах (среднее $\pm$ SD, n=3)

Результаты, полученные при использовании Spirotox в качестве модели для оценки токсичности БАД демонстрируют, что данный организм имеет высокую чувствительность к таким факторам, как состав вспомогательных веществ, оболочка таблеток, физико-химические свойства раствора, лекарственная форма цинка (например, лактат цинка). Все это указывает на то, что метод Spirotox может служить

эффективной биологической системой для контроля качества и безопасности цинксодержащих фармацевтических средств и БАД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен метод Spirotox, направленный на оценку фармакологической активности или токсичности цинксодержащих фармацевтических препаратов и БАДов. Методология основана на анализе концентрационно-временной зависимости выживаемости инфузорий *Spirostomum ambiguum* в сочетании с температурной динамикой биологических процессов. Экспериментальные данные свидетельствуют, что для *Sp. ambiguum* в условиях лиганд-индуцируемой гибели характерно формирование переходного состояния, кинетические параметры которого подчиняются уравнению Аррениуса. Этот метод доказывает наличие корреляции между значениями наблюдаемой энергии активации $^{obs}E_a$ и полулетальной дозы LD₅₀ у млекопитающих при пероральном приёме. Метод Spirotox демонстрирует превосходную гибкость в определении токсичности растворов — задача, которая недоступна для других инструментальных методов фармацевтического анализа. Одновременно этот метод четко выявляет взаимосвязь между такими факторами, как концентрация раствора, температура, уровень pH, размер частиц, распределение частиц и биологической активностью вещества. При тестировании цинксодержащих биологически активных добавок методом Spirotox также выявил тесное взаимодействие между лекарственной формой цинка и его биологической активностью. Можно утверждать, что Spirotox-тест полностью соответствует критериям развития устойчивой фармакологии, поскольку он соблюдает принцип 3R (Замена, Сокращение, Усовершенствование), направленный на минимизацию использования лабораторных животных. Более того, этот метод оптимизирует процесс на начальных этапах разработки новых лекарственных средств, что позволяет экономить время и ресурсы.

ВЫВОДЫ

1. Использование *Sp. ambiguum* для определения биологической активности трех гидратных форм сульфата цинка с концентрацией 0,001 М показало сходную биоактивность гекса- и гептагидрата сульфата цинка (142 ± 9 кДж/моль и 146 ± 2 кДж/моль), однако раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ обладает наибольшей биологической активностью (99 ± 10 кДж/моль, $n=5$). Показано, что данная тенденция сохраняется и для концентрации 0,01 М.

2. Комплексирование результатов биофармацевтического анализа методом Spirotox и физико-химических методов: ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием (НПБО), рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) и динамического светорассеяния (DLS) и лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS) было выявлено, что растворы обладают до фильтрования сохраняли свою историю пробоподготовки, несмотря на одинаковые концентрации и аналогичный метод приготовления растворов. В то же время, появление кластеров, в которых цинк играет роль кластерного центра, лигандами при наблюдении на DLS являются молекулы воды с разными координационными числами, создающие разные размеры частиц.

3. При определении влияния значения pH на токсичность раствора гидратов сульфата цинка для простейших *Sp. ambiguum*, было показано, что существует токсическая зависимость от pH. При приближении pH к 7 наблюдалось снижение энергии активации в 2,2 раза для гептагидрата сульфата цинка (от 142 ± 11 до 66 ± 11 кДж/моль) и в 1,6 раза для моногидрата сульфата цинка (111 ± 2 до 70 ± 1 кДж/моль, что подтверждает повышение токсичности. Установлено, что метод Spirotox эффективен для определения взаимосвязи pH/токсичность.

4. Исследование показало комбинированную токсичность при одновременном действии ФС, содержащих магний и цинк с концентрацией 0,001 моль/л на *Spirostomum ambiguum*. Обнаружено, что по мере снижения содержания цинка и

увеличения магния инфузории продолжают быть активными в течение более длительного периода времени по сравнению с периодами, когда уровень цинка повышался, а уровень магния снижался. При отношении 1:1 биологическая активность комплекса магния с цинком выше, чем биологической активности каждого вещества в отдельности.

5. Оценка содержания цинка в БАД произведена методом РФА, а биологическая активность – с помощью метода Spirotox. Благодаря этому показано влияние оболочки таблетки с вспомогательными веществами на биологическую активность раствора (с оболочкой $^{obs}Ea=46\pm8$ кДж/моль, без оболочки $^{obs}Ea = 95\pm8$ кДж/моль). Содержание цинка по РФА совпадает с результатом по Spirotox-test, но не соответствует у производителя у пиколината цинка.

6. Таким образом, проведена оценка биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы, лекарственных препаратов и биологически активных добавок с применением модели биотестирования Spirotox.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

DLS – Dynamic light scattering, динамическое светорассеяние

DMT1 – Divalent Metal Transporter 1, Транспортёр двухвалентных металлов 1

^{obs}**Ea** – кажущаяся энергия активации биологической активности соединений

LD₅₀ – средняя летальная доза токсического вещества, которая вызывает гибель половины членов испытываемой популяции (полулетальная доза)

LALLS – low-angle laser light scattering / малоугловое рассеяние лазерного света

MT – Metallothionein, металлотионеин, семейство цистеин-обогащенных белков, связывающих катионы двухвалентных металлов

Ph. Eur. – European Pharmacopoeia / фармакопея Евросоюза

SD – стандартное отклонение

ZIP – Zrt- and Irt-like proteins, семейство специфических белков-транспортёров катионов двухвалентных металлов

ZnT – Zinc transporter, семейство специфических белков-транспортёров катионов цинка

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия

АФИ – активный фармацевтический ингредиент

БАД – биологически активная добавка

Всемирной организации здравоохранения ВОЗ

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ККСА – количественной корреляции «структура-активность»

ЛВ – лекарственное вещество

НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение

ОФС – общая фармакопейная статья

РФА – рентгенофлуоресцентный анализ

РФС – рентгеновская флуоресцентная спектроскопия

Cu/Mg-СОД- медь-цинковая супероксиддисмутаза

ЛП – лекарственный препарат

ФС – фармакопейная статья

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fukada, T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis / T. Fukada, T. Kambe // *Metallomics: integrated biometal science*. – 2011. – V. 3. – N. 7. – P. 662–674. DOI 10.1039/c1mt00011j.
2. Raulin, J. Etudes chimiques sur la vegetation / J. Raulin // *Ann Sci Nat Bot Biol Veg.* – 1869. – V. 11. – P. 92–299.
3. Todd, W.R. Zinc in the nutrition of the rat / W.R.Todd, C.A. Elvehjem, E.B. Hart // *Am J Physiol.* – 1934. – V.107. – P. 146-156. DOI 10.1152/ajplegacy.1933.107.46.
4. Prasad, A.S. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia / A.S. Prasad, J.A.Halsted, M.Nadimi // *Am J Med.* – 1961. – V. 31– P. 532-546. DOI: 10.1016/0002-9343(61)90137-1.
5. Lind, J. A Case, Shewing the Efficacy of Flowers of Zinc, in the Epilepsy / J. Lind // *Lond Med J.* – 1786. – V.7. – P. 52-54.
6. WHO Trace Elements in Human Nutrition and Health [электронный ресурс]. – World Health Organisation. – 1996. – Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9241561734> (дата обращения: 15.03.2025).
7. Легонькова, Т.И. Клиническое значение цинка: результаты проспективного наблюдения за детьми в течение 14 лет / Т.И. Легонькова, О.Н. Штыкова, О.В. Войтенкова, Т.Г. Степина // *Медицинский совет*. – 2018. – N.11. – P. 147–153.
8. Lynch, R.J. Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; a review of the literature / R.J. Lynch // *Int Dent J.* – 2011. – V. 61. – N. 3. – P. 46–54. DOI 10.1111/j.1875-595X.2011.00049.x.
9. Maret, W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures / W. Maret // *Int J Mol Sci.* – 2016. – V. 17. – N. 1. – P. 66. DOI 10.3390/ijms17010066.
10. Keilin, D. Carbonic anhydrase / D. Keilin, T. Mann // *Nature*. – 1939. – V. 3644. – N. 144. – P. 442-443. DOI 10.1038/144442b0.

11. Vallee, B.L. Carboxypeptidase, a zinc metalloprotein / B.L. Vallee, H. Neurath // J Am Chem Soc. – 1955. – V. 217. – N. 1. – P. 253-61.
12. Зеленин, К.Н. Химия: учебник для медицинских вузов / К.Н. Зеленин. – СПб: Специальная литература, 1997. – 688 с.
13. McCord, J. M. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocytin) / J. M. McCord, I. Fridovich // The Journal of biological chemistry. – 1969. – V. 244. – N. 22. – P. 6049–6055. DOI 10.1016/S0021-9258(18)63504-5.
14. Hou, R. Zinc enzymes in medicinal chemistry / R. Hou, Y. He, G. Yan, S. Hou, Z. Xie, C. Liao // European journal of medicinal chemistry. – 2021. – N. 226. – 113877. DOI 10.1016/j.ejmech.2021.113877.
15. Tapiero, H. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins / H. Tapiero, K.D. Tew // Biomedicine & pharmacotherapie. –2003. – V. 57. – N. 9. – P. 399–411. DOI 10.1016/s0753-3322(03)00081-7.
16. Díaz, N. Hydration of zinc ions: theoretical study of $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{H}_2\text{O})_8^{2+}$ and $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ / N. Díaz, D. Suárez, K.M. Jr. Merz // Chem Phys Lett. –2003. – N. 326. – P. 288–292. DOI: 10.1016/S0009-2614(00)00744-2.
17. Maret, W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life / W. Maret // Advances in nutrition (Bethesda, Md.). –2003. – V. 4. – N. 1. – P. 82–91. DOI 10.3945/an.112.003038.
18. Kambe, T. Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells / T. Kambe, K.M. Taylor, D. Fu. // The Journal of biological chemistry. –2021. – N. 296. – 100320. DOI 10.1016/j.jbc.2021.100320.
19. Kambe, T. Understanding the Contribution of Zinc Transporters in the Function of the Early Secretory Pathway / T. Kambe, M. Matsunaga, T. A. Takeda // International journal of molecular sciences. – 2017. – V. 18. – N. 10. – 2179. DOI 10.3390/ijms18102179.

20. Parameswari, E. Metallothioneins: Diverse Protein Family to Bind Metallic Ions / E. Parameswari, T. Ilakiya, V. Davamani, P. Kalaiselvi, S. Paul Sebastian // IntechOpen. – 2021. – P. 153-165. DOI:10.5772/intechopen.97658.
21. Costa, M. I. Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential / M. I. Costa, A. B. Sarmiento-Ribeiro, A. C. Gonçalves // Int J Mol Sci. – 2023. – V. 24. – N. 5. – 2179. DOI 10.3390/ijms24054822.
22. Grzywacz, A. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level / A. Grzywacz, J. Gdula-Argasińska, B. Muszyńska, M. Tyszką-Czochara, T. Librowski, W. Opoka // Acta biochimica Polonica. – 2015. – V. 62. – N. 3. – P. 491–498. DOI 10.18388/abp.2015_1038.
23. Scott, B. J. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium / B. J. Scott, A. R. Bradwell // Clinical chemistry. – 1983. – V. 29. – N. 4. – P. 629–633. DOI 10.1093/clinchem/29.4.629.
24. Blindauer, C.A. Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin / C. A. Blindauer, I. Harvey, K. E. Bunyan, A. J. Stewart, D. Sleep, D. J. Harrison, S. Berezenko, P. J. Sadler. The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – V. 284. – N. 34. – P. 23116–23124. DOI 10.1074/jbc.M109.003459.
25. Преснякова, М.В. Биологическая роль цинка и его значимость в патогенезе расстройств аутистического спектра / М.В. Преснякова, О.В. Костина, Ж.В. Альбицкая // Социальная и клиническая психиатрия. – 2019. – Т. 29. – N. 3. – P. 63–70.
26. Liu, H. Y. The Multifaceted Roles of Zinc in Neuronal Mitochondrial Dysfunction / H. Y. Liu, J.R. Gale, I. J. Reynolds, J. H. Weiss, E. Aizenman // Biomedicines. – 2021. – V. 9. – N. 5. – 489. DOI 10.3390/biomedicines9050489.
27. Zhu, X. H. Quantitative imaging of energy expenditure in human brain / X. H. Zhu, H. Qiao, F. Du, Q. Xiong, X. Liu, X. Zhang, K. Ugurbil, W. Chen. // NeuroImage. – 2012. – V. 60. – N. 4. – P. 2107–2117. DOI 10.1016/j.neuroimage.2012.02.013.

28. Tamaki, N. Zinc as activating cation for muscle glycolysis / N. Tamaki, T. Ikeda, A. Funatsuka. // *Journal of nutritional science and vitaminology*. – 1983. – V. 29. – N. 6. – P. 655–662. DOI 10.3177/jnsv.29.655.
29. Bonaventura, P. Zinc and its role in immunity and inflammation / P. Bonaventura G. Benedetti, F. Albarède, P. Miossec // *Autoimmunity reviews*. – 2015. – V. 14. – N. 4. – P. 277–285. DOI 10.1016/j.autrev.2014.11.008.
30. Skrajnowska, D. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms / D. Skrajnowska, B. Bobrowska-Korczak // *Nutrients*. – 2019. – V.11. – N.10. – 2273. DOI 10.3390/nu11102273.
31. Andreini, C. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome / C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato // *Journal of proteome research*. – 2006. – V. 5. – N. 1. – P. 196–201. DOI 10.1021/pr050361j.
32. Laity, J.H. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity / J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright // *Current opinion in structural biology*. – 2001. – V. 11. – N. 1. – P. 39–46. DOI 10.1016/s0959-440x(00)00167-6.
33. Maret, W. Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of "Zinc Signals" / W. Maret // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – V. 18. – N. 11. – 2285. DOI 10.3390/ijms18112285.
34. Beyersmann, D. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells / D. Beyersmann, H. Haase // *Biometals*. – 2001. – N. 14. – P. 331–341. DOI 10.1023/a:1012905406548.
35. Takeda, A. Insight into cognitive decline from Zn²⁺ dynamics through extracellular signaling of glutamate and glucocorticoids / A. Takeda, H. Tamano // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – V. 611. – P. 93-99. DOI 10.1016/j.abb.2016.06.021

36. Maret, W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc / W. Maret // *Experimental gerontology*. – 2008. – V. 43. – N. 5. – P. 363-369. DOI 10.1016/j.exger.2007.11.005.
37. Maywald, M. Zinc in Human Health and Infectious Diseases / M. Maywald, L. Rink // *Biomolecules*. – 2022. – V. 12. N. 12. – P. 93-99. DOI 10.3390/biom12121748.
38. WHO Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk Factors [электронный ресурс]. – World Health Organization. – 2004. Режим доступа: <https://iris.who.int/handle/10665/42770> (дата обращения: 15.04.2025).
39. Subramanian Vignesh, K. Immunological orchestration of zinc homeostasis: The battle between host mechanisms and pathogen defenses / Subramanian Vignesh K., Deepe G. S. Jr. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – V. 611. – P. 66-78. DOI 10.1016/j.abb.2016.02.020.
40. Skrajnowska, D. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms / D. Skrajnowska, B. Bobrowska-Korczak // *Nutrients*. – 2029. – V. 11. – N. 10. – P. 2273. DOI 10.3390/nu11102273.
41. Ho, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk / E. Ho // *The Journal of nutritional biochemistry*. – 2004. – V. 15. – N. 10. – P. 572–578. DOI 10.1016/j.jnutbio.2004.07.005.
42. Prasad, A.S. Molecular Mechanisms of Zinc as a Pro-Antioxidant Mediator: Clinical Therapeutic Implications / A. S. Prasad, B. Bao // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8. – N. 6. – P. 164. DOI 10.3390/antiox8060164.
43. Skalny, A.V. Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19 (Review) / A. V. Skalny, L. Rink, O. P. Ajsuvakova, O. P., M. Aschner, V. A. Gritsenko, S. I. Alekseenko, A. A. Svistunov, D. Petrakis, D. A. Spandidos, J. Aaseth, A. Tsatsakis, A. A. Tinkov // *International journal of molecular medicine*. – 2020. – V. 46. – N. 1. – P. 17–26. DOI 10.3892/ijmm.2020.4575.

44. Marone, G. Physiological concentrations of zinc inhibit the release of histamine from human basophils and lung mast cells / G. Marone, M. Columbo, A. de Paulis, R. Cirillo, R. Giugliano, M. Condorelli // *Agents and actions*. – 1986. – V. 18. – N. 1-2. – P. 103–106. DOI 10.1007/BF01987995.
45. Chvapil, M. Effect of zinc on cells and biomembranes / M. Chvapil // *The Medical clinics of North America*. – 1976. – V. 60. – N. 4. – P. 799-812. DOI 10.1016/S0025 7125(16)31862-4.
46. Singh, K.P. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge / K. P. Singh, S. I. Zaidi, S. Raisuddin, A. K. Saxena, R. C. Murthy, P. K. Ray // *Immunopharmacology and immunotoxicology*. – 1992. – V. 14. – N. 4. – P. 813–840. DOI 10.3109/08923979209009237.
47. Prasad, A.S. Serum thymulin in human zinc deficiency / A. S. Prasad, S. Meftah, J. Abdallah, J. Kaplan, G. J. Brewer, J. F. Bach, M. Dardenne. *The Journal of clinical investigation*. – 1988. – V. 82. – N. 4. – P.1202–1210. DOI 10.1172/JCI113717.
48. Little, P. J. Zinc and cardiovascular disease / P. J. Little, R. Bhattacharya, A. E. Moreyra, I. L. Korichneva. – 2010. – V. 26. – N. 11. – P. 1050–1057. DOI 10.1016/j.nut.2010.03.007.
49. Tamaki, M. Role of zinc in type 2 diabetes / M. Tamaki, Y. Fujitani // *Nihon Eiseigaku Zasshi*. – 2014. – V. 69. – N. 1. – P. 15–23. DOI 10.1265/jjh.69.15.
50. Miao, X. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes / X. Miao, W. Sun, Y. Fu, L. Miao, L. Cai. *Frontiers of medicine*. – 2013. – V. 7. – N. 1. – 31–52. DOI 10.1007/s11684-013-0251-9.
51. Chabosseau, P. Zinc and diabetes / P. Chabosseau, G. A. Rutter // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2016. – V. 611. – P. 79–85. DOI 10.1016/j.abb.2016.05.022.
52. Hu, H. New anti-cancer explorations based on metal ions / H. Hu, Q. Xu, Z. Mo, X. Hu, Q. He, Z. Zhang, Z. Xu // *Journal of nanobiotechnology*. – 2022. – V. 20. – N.1. – 457. DOI 10.1186/s12951-022-01661-w.

53. Stockwell, B. R. Emerging Mechanisms and Disease Relevance of Ferroptosis / B. R. Stockwell, X. Jiang, W. Gu. // Trends in cell biology. – 2020. – V. 30. – N.6. – P. 478–490. DOI 10.1016/j.tcb.2020.02.009.
54. Chen, B. Cellular zinc metabolism and zinc signaling: from biological functions to diseases and therapeutic targets / B. Chen, P. Yu, W. N. Chan, F. Xie, Y. Zhang, L. Liang, K. T. Leung, K. W. Lo, J. Yu, G. M. K. Tse, W. Kang, K. F. To. // Signal transduction and targeted therapy. – 2024. – V. 9. – N.1. – 6. DOI 10.1038/s41392-023-01679-y.
55. Wang, J. Zinc dysregulation in cancers and its potential as a therapeutic target / J. Wang, H. Zhao, Z. Xu, X. Cheng // Cancer biology & medicine. – 2020. – V. 17. – N. 3. – P. 612–625. DOI 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0106.
56. Costello, L.C. A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer / L.C. Costello, R.B. Franklin, // Archives of biochemistry and biophysics. – 2016. – V. 611. – P. 100–112. DOI 10.1016/j.abb.2016.04.014.
57. Kambe, T. Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: Biochemical and molecular aspects / T. Kambe, T.A. Takeda, Y. Nishito // Archives of biochemistry and biophysics. – 2016. – V. 611. – P. 37–42. DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.035.
58. Jothimani, D. COVID-19: Poor outcomes in patients with zinc deficiency / D. Jothimani, E. Kailasam, S. Danielraj, B. Nallathambi, H. Ramachandran, P. Sekar, S. Manoharan, V. Ramani, G. Narasimhan, I. Kaliamoorthy, M. Rela // Int J Infect Dis. – 2020. – V. 100. – P. 343–349. DOI 10.1016/j.ijid.2020.09.014.
59. Wang, L. Efficacy of zinc given as an adjunct to the treatment of severe pneumonia: A meta-analysis of randomized, double-blind and placebo-controlled trials / L. Wang, Y. Song // Clin Respir J. – 2018. – V. 12. – N. 3. – P. 857–864. DOI 10.1111/crj.12646.

60. Porea, T.J. Zinc-induced anemia and neutropenia in an adolescent / T.J. Porea, J.W. Belmont, D.H. Mahoney Jr // *The Journal of pediatrics*. – 2020. – V. 136. – N. 5. – P. 688–690. DOI 10.1067/mpd.2000.103355.
61. Fosmire, G.J. Zinc toxicity / G.J. Fosmire // *The American journal of clinical nutrition*. – 1990. – V. 51. – N. 2. – P. 225–227. DOI 10.1093/ajcn/51.2.225.
62. Maret, W. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation / W. Maret, H. H. Sandstead // *J Trace Elem Med Biol*. – 2006. – V. 20. – N. 1. – P. 3-18. DOI 10.1016/j.jtemb.2006.01.006
63. Prasad, A.S. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism / A.S. Prasad, A. Miale Jr, Z. Farid, H. Sandstead, A. Schulert // *The Journal of laboratory and clinical medicine*. – 1963. – V. 61. – P. 537–549.
64. Baarz, B.R. Rebalancing the unbalanced aged immune system - A special focus on zinc / B.R. Baarz, L. Rink // *Ageing research reviews*. – 2022. – V. 74. – 101541. DOI 10.1016/j.arr.2021.101541.
65. Gupta, S. Zinc deficiency in low- and middle-income countries: prevalence and approaches for mitigation / S. Gupta, A.K.M. Brazier, N. M. Lowe // *J Hum Nutr Diet*. – 2020. – V. 33. – N. 5. – P. 624–643. DOI 10.1111/jhn.12791.
66. Foster, M. Vegetarian diets across the lifecycle: impact on zinc intake and status / M. Foster, S. Samman. *Advances in food and nutrition research*. – 2015. – V. 74. – P. 93–131. DOI 10.1016/bs.afnr.2014.11.003.
67. Cediël, G. Zinc Deficiency in Latin America and the Caribbean / G. Cediël, M. Olivares, A. Brito, H. Cori, D. López de Romaña // *Food and nutrition bulletin*. – 2015. – V. 36. – N. 2. – P. 129–138. DOI 10.1177/0379572115585781.
68. Skalny, A.V. *Elemental Status of the Russian Population* / Ed. by A.V. Skalny, M.F. Kiseleva. — St. Petersburg : Medkniga ELBI-SPb, 2013.

69. Лиманова, О.А. Обеспеченность микронутриентами и женское здоровье: интеллектуальный анализ клинико-эпидемиологических данных / О.А. Лиманова, И.Ю.Торшин, И.С. Сардарян, А.Г. Калачева, А. Nababpashev, D. Karpuchin, A. Kudrin, Н.В. Юдина, Е.Ю. Егорова, А.Ю. Белинская, Т.Р. Гришина, А.Н. Громов, Л.Э. Федотова, К.В. Рудаков, О.А. Громова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. – Т.13. № 2. – Р. 5–15.
70. Gupta, M. Zinc therapy in dermatology: a review / M. Gupta, V. K. Mahajan, K. S. Mehta, P. S. Chauhan // *Dermatol Res Pract.* – 2014. – 709152. DOI 10.1155/2014/709152.
71. Devi, C.B. Zinc in human health / C.B. Devi, T. Nandakishore, N. Sangeeta, G. Basar, N.O. Devi, S. Jamir, M.A. Singh // *Journal of Dental and Medical Sciences.* – 2014. – V. 13. – N. 7. – P. 18–23. DOI 10.9790/0853-13721823.
72. Fatima, T. Zinc: A precious trace element for oral health care? / T. Fatima, Z. B. Haji Abdul Rahim, C. W. Lin, Z. Qamar // *JPMMA. The Journal of the Pakistan Medical Association.* – 2016. – V. 66. – N. 8. – P. 1019–1023.
73. Deshpande, J. Zinc: The trace element of major importance in human nutrition and health / J. Deshpande, M. Joshi, P. Giri // *Int J Med Sci Public Health.* – 2013. – V. 2. – N. 1. – P. 1–6. DOI 10.5455/ijmsph.2013.2.1-6.
74. Kaur, K. Zinc: The Metal of Life / K. Kaur, R. Gupta, S. A. Saraf, S. K. Saraf. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* – 2014. – V. 13. – N. 4. – P. 358–376. DOI 10.1111/1541-4337.12067.
75. Alker, W. Zinc and Sepsis / W. Alker, H. Haase // *Nutrients.* – 2018. – V. 10. – N. 8. – 976. DOI 10.3390/nu10080976
76. Pawlitzki, M. Lower Serum Zinc Levels in Patients with Multiple Sclerosis Compared to Healthy Controls / M. Pawlitzki, J. Uebelhör, C. M. Sweeney-Reed, H. Stephanik, J. Hoffmann, A. Lux, D. Reinhold // *Nutrients.* – 2018. – V. 10. – N. 8. – 967. DOI 10.3390/nu10080967.

77. Громова, О.А. Цинк как необходимый элемент профилактики врожденных патологий плода / О.А. Громова, И.Ю. Торшин // Мед. Алфавит. – 2016. – Т. 1. – № 7. – С. 19–25.
78. Прасад, А.С. Цинк для человека: терапевтическое действие и токсичность / А.С. Прасад // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 6. – С. 9–13.
79. Gower-Winter, S.D. Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior / S.D. Gower-Winter, C.W. Levenson // BioFactors (Oxford, England). – 2012. – V. 38. – N. 3. – P. 186-193. DOI 10.1002/biof.1012.
80. Sandstead, H.H. History of zinc as related to brain function / H.H. Sandstead, C.J. Frederickson, J.G. Penland // The Journal of nutrition. – 2000. – V. 130. – N. 2S. – P. 496S–502S. DOI 10.1093/jn/130.2.496S.
81. National Institutes of Health. Zinc, Fact Sheet for Health Professionals [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional> (дата обращения: 06.10.2022).
82. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/?L=0> (дата обращения: 06.10.2022).
83. Agostoni, C. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for folate / C. Agostoni, R. Canani, S. Fairweather-Tait, M. Heinonen, H. Korhonen, S. La Vieille, R. Marchelli, A. Martin, A. Naska, M. Neuhäuser-Berthold // EFSA J. – **2014**. – N. 12. – 3893. DOI 10.2903/j.efsa.2014.3893.
84. ANSES. Dietary Reference Values for Vitamins and Minerals [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.anses.fr/en/content/dietary-reference-values-vitamins-and-minerals> (дата обращения: 21.05.2024).

85. Ministry of Health, Labour and Welfare. Dietary Reference Intakes for Japanese / Ministry of Health, Labour and Welfare. — Tokyo : Ministry of Health, Labour and Welfare, 2015. — 269 p.
86. WHO Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition [электронный ресурс]. — World Health Organization. — 2004. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9241546123> (дата обращения: 15.04.2025).
87. Krebs, N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract / N.F. Krebs // The Journal of nutrition. — 2000. — V. 130. — N. 5S. — P. 1374S–7S. DOI 10.1093/jn/130.5.1374S.
88. Steinhardt, H. J. Interaction between transport of zinc and other solutes in human intestine / H.J. Steinhardt, S.A. Adibi // The American journal of physiology. — 1984. — V. 247. — N. 2. — P. G176–G182. DOI 10.1152/ajpgi.1984.247.2.G176.
89. King, J.C. Zinc: An essential but elusive nutrient / J. C. King // The American journal of clinical nutrition. — 2011. — V. 94. — N. 2. — P. 679S–84S. DOI 10.3945/ajcn.110.005744
90. Ford, D. Intestinal and placental zinc transport pathways / D. Ford // The Proceedings of the Nutrition Society. — 2004. — V. 63. — N. 1. — P. 21–29. DOI 10.1079/PNS2003320.
91. Otten, J.J. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements / J.J. Otten, J.P. Hellwig, L.D. Meyers. — Washington: National Acad. Press, 2006.
92. Prasad, A.S. Discovery of human zinc deficiency: Its impact on human health and disease / A. S. Prasad // Advances in nutrition. — 2013. — V. 4. — N. 2. — P. 176–190. DOI 10.3945/an.112.003210.
93. Prasad, A.S. Duration of symptoms and plasma cytokine levels in patients with the common cold treated with zinc acetate. A randomized, double-blind, placebo-controlled

trial / A.S. Prasad, J.T. Fitzgerald, B. Bao, F.W. Beck, P.H. Chandrasekar // *Ann Intern Med.* – 2000. – V. 133. – N. 4. – P. 245–252. DOI 10.7326/0003-4819-133-4-200008150-00006.

94. Godfrey, J.C. Zinc gluconate and the common cold: A controlled clinical study / J.C. Godfrey, B. Conant Sloane, D.S. Smith, J.H. Turco, N. Mercer, N. J. J. // *The Journal of international medical research.* – 1992. – V. 20. – N. 3. – P. 234–246. DOI 10.1177/030006059202000305.

95. Turner, R.B. Effect of treatment with zinc gluconate or zinc acetate on experimental and natural colds / R.B. Turner, W.E. Cetnarowski // *Clin Infect Dis.* – 2000. – V. 31. – N. 5. – P. 1202–1208. DOI 10.1086/317437.

96. Veverka, D.V. Use of zinc supplements to reduce upper respiratory infections in United States Air Force Academy cadets / D.V. Veverka, C. Wilson, M.A. Martinez, R. Wenger, A. Tamosuinas // *Complement Ther Clin Pract.* – 2009. – V. 15. – N. 2. – P. 91–95. DOI 10.1016/j.ctcp.2009.02.006.

97. Brooks, W.A. Zinc for severe pneumonia in very young children: Double-blind placebo-controlled trial / W.A. Brooks, M. Yunus, M. Santosham, M. A. Wahed, K. Nahar, S. Yeasmin, R. E. Black, R.E. // *Lancet.* – 2004. – V. 363. – N. 9422. – P. 1683–1688. DOI 10.1016/S0140-6736(04)16252-1.

98. Bhutta, Z.A. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. Zinc Investigators' Collaborative Group / Z. A. Bhutta, R. E. Black, K. H. Brown, J. M. Gardner, S. Gore, A. Hidayat, F. Khatun, R. Martorell, N. X. Ninh, M. E. Penny, J. L. Rosado, S. K. Roy, M. Ruel, S. Sazawal, A. Shankar // *The Journal of pediatrics.* – 1999. – V. 135. – N. 6. – P. 689–97. DOI 10.1016/s0022-3476(99)70086-7.

99. Jones, G. How many child deaths can we prevent this year? / G. Jones, R. W. Steketee, R. E. Black, Z. A. Bhutta, S. S. Morris, Bellagio Child Survival Study Group // *Lancet.* – 2003. – V. 362. – N. 9377. – P. 65–71. DOI 10.1016/S0140-6736(03)13811-1.

100. King, J.C. Zinc / J.C. King, R.J. Cousins // *Modern Nutrition in Health and*

Disease / A.C. Ross, B. Caballero, R.J. Cousins, K.L. Tucker, T.R. Ziegler, Eds. – 11th ed. – Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins, 2014. – P. 189-205.

101. Kočańczyk, T. Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins--insights into zinc regulation / T. Kočańczyk, A. Drozd, A. Krężel // *Metallomics*. – 2015. – V. 7. – N. 2. – P. 244–257. DOI 10.1039/c4mt00094c.

102. Hughes, S. The effect of zinc supplementation in humans on plasma lipids, antioxidant status and thrombogenesis / S. Hughes, S. Samman // *J Am Coll Nutr*. – 2006. – V. 25. – P. 285–291. DOI 10.1080/07315724.2006.10719537.

103. Avan, A. The Role of Zinc in the Treatment of Wilson's Disease / A. Avan, A. Członkowska, S. Gaskin, A. Granzotto, S. L. Sensi, T. U. Hoogenraad // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – V. 23. – N. 16. – 9316. DOI 10.3390/ijms23169316.

104. Brenner, B. E. Metal Fume Fever [Электронный ресурс] / B. E. Brenner, D. Keyes // In *StatPearls*. – 2023. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583199>.

105. Vogelmeier, C. Pulmonary involvement in zinc fume fever / C. Vogelmeier, G. König, K. Bencze, G. Fruhmahn // *Chest*. – 1987. – V. 92. – N. 5. – P. 946–948. DOI 10.1378/chest.92.5.946.

106. Plum, L.M. The essential toxin: Impact of zinc on human health / L.M. Plum, L. Rink, H. Haase // *Int J Environ Res Public Health*. – 2000. – V. 7. – N. 4. – P. 1342–1365. DOI 10.3390/ijerph7041342.

107. Brown, M.A. Food poisoning involving zinc contamination / M. A. Brown, J. V. Thom, G. L. Orth, P. Cova, J. Juarez. *Arch Environ Health*. – 1964. – V. 8. – N. 34. – P. 657–660. DOI 10.1080/00039896.1964.10663736.

108. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc [Электронный ресурс]. - National

Academies Press (US): Washington. – 2001. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057538/>

109. Yokoyama, J. Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons / J. Yokoyama, J. Koh, D. W. Choi // *Neurosci Lett.* – 1986. – V. 71. – N. 3. – P. 351-355. DOI 10.1016/0304-3940(86)90646-4.

110. Frederickson, C.J. The neurobiology of zinc in health and disease / C. J. Frederickson, J. Y. Koh, A. I. Bush // *Nature reviews. Neuroscience.* – 2005. – V. 6. – N. 6. – P. 449–462. DOI 10.1038/nrn1671.

111. Bloom, A. Zinc supplementation and its benefits in the management of chronic liver disease: An in-depth literature review / A. Bloom, S. Bloom, H. Silva, A. J. Nicoll, R. Sawhney // *Annals of hepatology.* – 2021. – V. 25. – 100549. DOI 10.1016/j.aohp.2021.100549.

112. Siesjo, B.K. Basic mechanisms of traumatic brain damage / B.K. Siesjo // *Ann Emerg Med.* – 1993. – V. 22. – N. 6. – P. 959–969. DOI 10.1016/s0196-0644(05)82736-2.

113. Fredrickson, C.J. The neurobiology of zinc in health and disease / C. J. Fredrickson, J. Y. Koh, A. I. Bush // *Nature reviews. Neuroscience.* – 2005. – V. 6. – N. 6. – P. 449–462. DOI 10.1038/nrn1671.

114. Cuajungco, M.P. Zinc metabolism in the brain: Relevance to human neurodegenerative disorders / M. P. Cuajungco, G. J. Lees // *Neurobiol Disease.* – 1997. – V. 4. – P. 137-69. DOI 10.1006/nbdi.1997.0163.

115. Frederickson, C.J. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron / C. J. Frederickson, S. W. Suh, D. Silva, R. B. Thompson // *The Journal of nutrition.* – 2000. – V. 130. – N. 5S. – P. 1471S-1483S. DOI 10.1093/jn/130.5.1471S.

116. Weiss, J. H. Zn(2+): A novel ionic mediator of neural injury in brain disease / J. H. Weiss, S. L. Sensi, J. Y. Koh // *Trends in pharmacological sciences.* – 2000. – V. 21. – N. 10. – P. 395-401. DOI 10.1016/s0165-6147(00)01541-8.

117. Ciubotariu, D. Zinc involvement in opioid addiction and analgesia—should zinc supplementation be recommended for opioid-treated persons? / D. Ciubotariu, C. M. Ghiciuc, C. E. Lupusoru // *Subst Abus Treat Prev Policy*. – 2015. – V. 10. – 29. DOI 10.1186/s13011-015-0025-2.
118. Schoofs, H. Zinc Toxicity: Understanding the Limits / H. Schoofs, J. Schmit, L. Rink // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2024. – V. 29. – N.13. – 3130. DOI 10.3390/molecules29133130.
119. Плетенёва, Т.В. Токсикологическая химия / Т.В., Плетенёва, Е.М. Саломатин, А.В. Сыроешкин и др. // Учебник для вузов. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2005. – 512 с.
120. McCall, K.A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes / K.A. McCall, C.-C. Huang, C.A. Fierke // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130. – N 5. – P. 1437S–1446S. DOI 10.1093/jn/130.5.1437S.
121. Vallee, B.L. The biochemical basis of zinc physiology / B.L. Vallee, K.H. Falchuk // *Physiol. Rev.* – 1993. – V. 31. – P. 532-546. DOI 10.1152/physrev.1993.73.1.79.
122. Волошин, В.П. Структуры сеток водородных связей и динамика молекул воды в конденсированных системах / В.П. Волошин, Е.А. Желиговская, Г.Г. Маленков, Ю.И.Наберухин, Д.Л. Тытик // *Рос. Хим. Ж.*– 2001. – Т.XLV. - №3 – С. 31-37.
123. Смирнов, А.Н. Супранадмолекулярные комплексы воды / А.Н. Смирнов, В.Б. Лапшин, А.В. Балышев, И.М. Лебедев, А.В. Сыроешкин // *Электронный журнал «Исследовано в России»*. – 2004. – №38. – С. 413–421.
124. Pearson, R.G. Hard and Soft Acids and Bases / R. G. Pearson // *Journal of the American Chemical Society*. – 1963. – V. 85. – N 22. – P. 3533–3539. DOI 10.1021/ja00905a001.
125. Burgess, J. *Comprehensive Coordination Chemistry* / J. Burgess, G. Wilkenson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty. - Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1987.

126. Prince, R. H. Comprehensive Coordination Chemistry / R. H. Prince, Wilkenson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty. - Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1987.
127. Wakita, H. Determination of Zinc Iodide Complexes in Aqueous Solution / H. Wakita, G. Johanson, M. Sandstrom, P. L. Goggin, H. J. Ohtaki // *Solution Chem.* -1991. – V. 20. – P. 643.
128. Persson, I. Structures of hydrated metal ions in solid state and aqueous solution / I. Persson // *Liquids.* – 2022. – V. 2. – N 3. – P. 210–242. DOI 10.3390/liquids2030014.
129. Jana, C. Theoretical insight into the coordination number of hydrated Zn^{2+} from gas phase to solution / C. Jana, G. Ohanessian, C. Clavaguéra / *Theor Chem Acc* // – 2016. – V. 135. – 141. DOI 10.1007/s00214-016-1887-8.
130. Wang, P. Structures and Spectroscopic Properties of Hydrated Zinc(II) Ion Clusters $[Zn^{2+}(H_2O)_n]$ ($n = 1-8$) by Ab Initio Study / P. Wang, Y. Su, R. Shi, X. Huang, J. Zhao // *J Clust Sci.* – 2023. – V. 34. – P. 1625–1632. DOI 10.1007/s10876-022-02277-8.
131. Hochella, M. F. Nanominerals, Mineral Nanoparticles, and Earth Systems / M. F. Hochella, S. K. Lower, P. A. Maurice, R. L. Penn, N. Sahai, D. L. Sparks, B. S. Twining // *Science.* – 2008. – V. 319. – P. 1631-5. DOI 10.1126/science.1141134.
132. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – 5-е изд. Перераб. и доп. – М. Химия, 1979. – 480 с.
133. Burgess, J. In: Metal ions in solution / J. Burgess. - New York : Ellis Horwood, 1978. –147 p.
134. Baes, C.F. In: The Hydrolysis of Cations / C.F. Baes, R.E. Mesmer. - New York, 1976. – 489 p.
135. Choi, C.H. Effects of fluid flow on the growth and assembly of ZnO nanocrystals in a continuous flow microreactor / C. H. Choi, Y. W. Su, C. H. Chang // *CrystEngComm.* – 2013. – V. 15. – N. 17. – P. 3326-3333. DOI 10.1039/C3CE26699K.

136. Guo, X. Opportunities and challenges of zinc anodes in rechargeable aqueous batteries / X. Guo, G. J. He // *Mater Chem A*. – 2023. – V. 11. – N. 23. – P. 11987–12001. DOI 10.1039/D3TA01904G.

137. Krężel, A. The biological inorganic chemistry of zinc ions / A. Krezel, W. Maret // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – V. 611. – P. 3-19. DOI 10.1016/j.abb.2016.04.010.

138. Gül, A. Acute Toxicity of Zinc Sulphate (ZnSO_4 , H_2O) to Guppies (*Poecilia reticulata* P., 1859) / A. Gül, M. Yilmaz, Z. Isilak // *Journal of Science*. – 2009. – V. 2. – N. 2. – P. 59-65.

139. Bradley, R.W. The influence of Ph, water hardness and alkalinity on the acute lethality of zinc on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / R.W. Bradley, J.B. Sprague // *Can J Fish Aquat Sci*. – 1985. – V. 42. – N. 4. – P. 731–736. DOI 10.1139/f85-094.

140. Cusimano, R.F. Effects of Ph on the toxicities of cadmium, copper and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*) / R.F. Cusimano, D.F. Brakke, G.A. Chapman // *Can J Aquat Sci*. – 1986. – V. 43. – N. 8. – P. 1497-1503. DOI: 10.1139/f86-187.

141. Simon, E. W. The Effect of pH on the Biological Activities of Weak Acids and Bases II. Other Relationships Between pH and Activity / E. W. Simon, H. Beevers // *The New Phytologist*. – 1952. – V. 51, - N. 2, - P. 191-197.

142. Wilde, K.L. The effect of Ph on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.) / K.L. Wilde, J.L. Stauber, S.J. Markich, N.M. Franklin, P.L. Brown // *Arch Environ Contam Toxicol*. – 2006. – V. 51, – N. 2. – P. 174–185. DOI 10.1007/s00244-004-0256-0.

143. Starodub, M.E. Influence of complexation and Ph on individual and combined heavy metal toxicity to a freshwater green alga / M.E. Starodub, P. Wong, C. Mayfield, Y. Chau // *Can J Fish Aquat Sci*. – 1987. – V. 44, – N. 6. – P. 1173-1180. DOI 10.1139/f87-140.

144. François, L. Ph modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non- competitive interactions: implications for an

algal BLM / L. François, C. Fortin, P. G. C. Campbell // Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands). – 2007. – V. 84. – N. 2. – P. 123–132. DOI 10.1016/j.aquatox.2007.02.019.

145. De Schamphelaere, K.A. Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry / K.A. De Schamphelaere, C.R. Janssen // Environ Sci Technol. – 2006. – V. 40. – N. 14. – P. 4514–4522. DOI 10.1021/es0525051.

146. Andersen, O. Chelation of cadmium / O. Andersen // Environmental Health Perspectives. – 1984. – V. 54. – P. 249-266. DOI 10.1289/ehp.8454249.

147. Hill, C.H. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements / C.H. Hill, G. Matrone // Federation proceedings. – 1970. – V. 29. – N. 4. – P. 1474-1481.

148. Abbaspour, N. Review on iron and its importance for human health / N. Abbaspour, R. Hurrell, R. Kelishadi // J Res Med Sci. – 2014. – V. 19. – N. 2. – P. 164–174.

149. McDowell, L.R. Minerals in animals and human nutrition / L.R. McDowell. - 2nd Edition: Elsevier Science BV. - Amsterdam, 2003. -144 p.

150. Kondaiah, P. Iron and Zinc Homeostasis and Interactions: Does Enteric Zinc Excretion Cross-Talk with Intestinal Iron Absorption? / P. Kondaiah, P. S. Yaduvanshi P. A. Sharp, R. Pullakhandam // Nutrients. – 2019. – V. 11. – N. 8. –1885. DOI 10.3390/nu11081885.

151. Whittaker, P. Iron and zinc interactions in humans / P. Whittaker // The American journal of clinical nutrition. – 1988. – V. 68. – N. 2. – P. 442S-446S. DOI 10.1093/ajcn/68.2.442S.

152. Solomons, N.W. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition / N.W. Solomons // The Journal of nutrition. – 1986. – V. 116. – N. 6. – P. 927–935. DOI 10.1093/jn/116.6.927.

153. Munem, H.A.A. Effect of zinc deficiency on hair loss in pregnant women / H. A. A. Munem, A. S. Jassum. *International Journal of Health Sciences*. – 2022. – V.6. – N.54. – P. 5701–5710. DOI 10.53730/ijhs.v6n54.9787.

154. Ma, A.G. Comparison of serum levels of iron, zinc and copper in anaemic and non-anaemic pregnant women in China / A.G. Ma, X.C. Chen, R.X. Xu, M.C. Zheng, Y. Wang, J.S. Li // *Asia Pac J Clin Nutr*. – 2004. – V. 13. – N. 4. – P. 348–352.

155. El Hendy, H.A. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats / H.A. El Hendy, M.I. Yousef, N.I. Abo El-Naga // *Toxicology*. – 2001. – V. 167. – N. 2. – P. 163–170. DOI 10.1016/s0300-483x(01)00373-0.

156. Sreedhar, B. Modulation of aconitase, metallothionein, and oxidative stress in zinc-deficient rat intestine during zinc and iron repletion / B. Sreedhar, K. M. Nair // *Free Radic Biol Med*. – 2005. – V. 39. – N. 8. – P. 999–1008. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.026.

157. Kilari, S. Zinc inhibits oxidative stress-induced iron signaling and apoptosis in Caco-2 cells / S. Kilari, R. Pullakhandam, K. M. Nair // *Free Radic Biol Med*. – 2010. – V. 48. – N. 7. – P. 961–968. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.019.

158. Alarcon, K. Effects of separate delivery of zinc or zinc and vitamin A on hemoglobin response, growth, and diarrhea in young Peruvian children receiving iron therapy for anemia / K. Alarcon, P.W. Kolsteren, A.M. Prada, A.M. Chian, R.E. Velarde, I.L. Pecho, T.F. Hoeree // *Am. J. Clin. Nutr*. – 2004. – V. 80. – N. 5. – P. 1276–1282. DOI 10.1093/ajcn/80.5.1276.

159. Maares, M. A. Guide to Human Zinc Absorption: General Overview and Recent Advances of In Vitro Intestinal Models / M. Maares, H. Haase // *Nutrients*. – 2020. – V. 12. – N. 3. – 762. DOI 10.3390/nu12030762.

160. Kondaiah, P. Iron and Zinc Homeostasis and Interactions: Does Enteric Zinc Excretion Cross-Talk with Intestinal Iron Absorption? / P. Kondaiah, P. S. Yaduvanshi, P.A.

Sharp, R. Pullakhandam // *Nutrients*. – 2019. – V. 11. – N. 8. – 1885. DOI 10.3390/nu11081885.

161. O'Brien, K. O. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant Peruvian women / K. O. O'Brien, N. Zavaleta, L. E. Caulfield, J. Wen, J., S. A. Abrams // *J Nutr.* – 2000. – V. 130. – N. 9. – P. 2251-2255. DOI 10.1093/jn/130.9.2251.

162. Bougle, D. Long-term effects of iron:zinc interactions on growth in rats / D. Bouglé, A. Isfaoun, F. Bureau, D. Neuville, P. Jauzac, P. Arhan // *Biol Trace Elem Res.* – 1999. – V. 67. – N. 1. – P. 37-48. DOI 10.1007/BF02784273.

163. Lönnerdal, B. Dietary factors influencing zinc absorption / B. Lönnerdal // *J Nutr.* – 2000. – V. 130. – N. 5. – P. 1378S-1383S. DOI 10.1093/jn/130.5.1378S.

164. Bisaglia, M. Copper ions and Parkinson's disease: why is homeostasis so relevant? / M. Bisaglia, L. Bubacco // *Biomol Ther.* – 2020. – V. 10. – N. 2. – P. 1–14. DOI 10.3390/biom10020195.

165. Puchkova, L. V. Silver ions as a tool for understanding different aspects of copper metabolism / L. V. Puchkova, M. Brogini, E. V. Polishchuk, E. Y. Ilyechova, R. S. Polishchuk // *Nutrients*. – 2019. – V. 11. – N. 6. – 1364. DOI 10.3390/nu11061364.

166. Iakovidis, I. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach / I. Iakovidis, I. Delimaris, S. M. Piperakis // *Mol Biol Int.* – 2011. – V. 2011. – 594529. DOI 10.4061/2011/594529.

167. Harris, E.D. Copper as a cofactor and regulator of copper, zinc superoxide dismutase / E. D. Harris // *J Nutr.* – 1992. – V. 122. – N. 2. – P. 636–640 DOI 10.1093/jn/122.suppl_3.636.

168. Ribeiro, S. M. Copper-zinc ratio and nutritional status in colorectal cancer patients during the perioperative period / S. M. Ribeiro, A. M. Moya, C. B. Braga, F. A. Domenici, M. R. Feitosa, O. Feres, J. J. Rocha, S. F. Cunha, // *Acta Cir Bras.* – 2016. – V. 31. – N. 1. – P. 24–28. DOI 10.1590/S0102-86502016001300006.

169. Chasapis, C.T. Recent aspects of the effects of zinc on human health / C.T. Chasapis, P.A. Ntouna, C.A. Spiliopoulou, M. E. Stefanidou // *Arch Toxicol.* – 2020. – V. 94. – N. 5. – P. 1443–1460. DOI 10.1007/s00204-020-02702-9.
170. Olechnowicz, J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism / J. Olechnowicz, A. Tinkov, A. Skalny, J. Suliburska // *J Physiol Sci.* – 2018. – V. 68. – N. 1. – P.19–31. DOI 10.1007/s12576-017-0571-7
171. Kanumakala, S. Paramidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease / S. Kanumakala, A. Boneh, M. Zacharin // *J Inherit Metab Dis.* – 2002. – V. 25. – N. 5. – P. 391–398. DOI 10.1023/a:1020103901969.
172. Uriu-Adams, J. Y. Copper, oxidative stress, and human health / J. Y. Uriu-Adams, C. L. Keen // *Mol Asp Med.* – 2005. – V. 26. – N. 4-5. – P.268–298. DOI 10.1016/j.mam.2005.07.015.
173. Bremner, I. Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep / I. Bremner, B. W. Young, C. F. Mills // *British Journal of Nutrition.* – 1976. – V. 36. – N. 3. – P.551-561. DOI 10.1079/bjn19760108.
174. Hall, A. C. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat / A. C. Hall, B. W. Young, I. Bremner // *Journal of inorganic biochemistry.* – 1979. – V. 11. – N. 1. – P. 57–66. DOI 10.1016/s0162-0134(00)80054-9.
175. L'Abbe, M. R. The effects of dietary zinc on the activity of copper-requiring metalloenzymes / M. R. L'Abbe, P. W. Fischer // *Journal of Nutrition.* – 1984. – V. 114. – N. 5. – P. 823–828. DOI 10.1093/jn/114.5.823 114,823-828.
176. Igic, P.G. Toxic effects associated with consumption of zinc / P.G. Igic, E. Lee, W. Harper, K. W. Roach // *Mayo Clin Proc.* – 2002. – V. 77. – N. 7. – P. 713-716. DOI 10.4065/77.7.713.
177. Ogiso, T. Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats. II. Binding of copper and zinc to cytosol proteins in the intestinal mucosa / T. Ogiso, N. Ogawa, T. Miura // *Chem Pharm Bull.* – 1979. – V. 27. – N. 2. – P. 515-521. DOI 10.1248/cpb.27.515.

178. Gunturu, S. Copper and zinc. *Geriatric Gastroenterology* / S. Gunturu, T. S. Dharmarajan // Cham: Springer International Publishing. - 2020. - P. 1–17. DOI 10.1007/978-3-319-90761-1_25-1.

179. Kamińska, J. Characterization of four peptides from milk fermented with kombucha cultures and their metal complexes-in search of new biotherapeutics / J. Kamińska, A. Hecel, J. Słowik, A. Rombel-Bryzek, M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska // *Frontiers in molecular biosciences*. – 2024. – V. 11. – 1366588. DOI 10.3389/fmolb.2024.1366588.

180. Rude, R.K. *Magnesium* / R.K. Rude // *Modern Nutrition in Health and Disease*:11th ed. – 2012. – P.159-75.

181. Lee, H.H. Zinc absorption in human small intestine / H. H. Lee, A. S. Prasad, G. J. Brewer, C. Owyang C // *Am J Physiol*. – 1989. – V. 256. – P. G87–G91. DOI 10.1152/ajpgi.1989.256.1.G87.

182. Taylor, A.N. Vitamin D3 dependent factor influencing calcium binding by homogenate of chick intestinal mucosa / A. N. Taylor, R. H. Wasserman // *Nature*. – 1965. – V. 205. – P. 248-250. DOI 10.1038/205248a0.

183. Davies, N.T. Studies on the absorption of zinc by rat intestine / N.T. Davies // *Br J Nutr*. – 1980. – V. 43. – P. 189–203. DOI 10.1079/BJN19800078.

184. Spencer, H. Inhibitory effects of zinc on magnesium balance and magnesium absorption in man / H. Spencer, C. Norris, D. Williams // *Journal of the American College*. – 1994. – V. 13. – N. 5. – P. 479-84. DOI 1080/07315724.1994.10718438.

185. Hamedifard, Z. The effects of combined magnesium and zinc supplementation on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease / Z. Hamedifard, A. Farrokhian, Ž. Reiner, F. Bahmani, Z. Asemi, M. Ghotbi, M. Taghizadeh // *Lipids in Health and Disease*. – 2020. – V.19. – N. 1. – 112. DOI 10.1186/s12944-020-01298-4.

186. Dawson-Hughes, B. Effects of calcium carbonate and hydroxyapatite on zinc and iron retention in postmenopausal women / B. Dawson-Hughes, F. H. Seligson, V. A. Hughes

// The American journal of clinical nutrition. – 1986. – V. 44. – N. 1. – P. 83–88. DOI 10.1093/ajcn/44.1.83.

187. Yan, L. The effect of long-term calcium supplementation on indices of iron, zinc and magnesium status in lactating Gambian women / L. Yan, A. Prentice, B. Dibba, L. M. Jarjou, D. M. Stirling, S. Fairweather-Tait // The British journal of nutrition. – 1996. – V. 76. – N. 6. – P. 821–831. DOI 10.1079/bjn19960089.

188. House, W.A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc / W.A. House // Field Crops Research. – 1999. – V. 60. – P. 115–141. DOI 10.1016/S0378-4290(98)00136-1.

189. Rickard, S.E. Interactions and biological effects of phytic acid / S. E. Rickard, L. U. Thompson // Antinutrients and phytochemicals in food. – 1997. – V.17. – P. 294–312. DOI 10.1021/bk-1997-0662.ch017.

190. Fordyce, E.J. Phytate $\times$ calcium/zinc molar ratios: Are they predictive of zinc bioavailability? / E.J. Fordyce, R.M. Forbes, K.R. Robbins, J.W. Erdman // Journal of Food Science. – 1987. – V. 52. – N. 2. – P. 440–444. DOI 10.1111/j.1365-2621.1987.tb06634.x.

191. Bernhoft, R. A. Cadmium toxicity and treatment / R. A. Bernhoft // Sci World J. – 2013. – V. 2013. – 394652. DOI 10.1155/2013/394652.

192. Yu, H.T. Zinc as a countermeasure for cadmium toxicity / H. T. Yu, J. Zhen, J. Y. Leng, L. Cai, H. L. Ji, B. B. Keller // Acta Pharmacol Sin. – 2021. – V. 42. – N. 3. – P. 340–346. DOI 10.1038/s41401-020-0396-4.

193. Pabis, K. Zinc supplementation can reduce accumulation of cadmium in aged metallothionein transgenic mice / K. Pabis, C. Gundacker, R. Giacconi, A. Basso, L. Costarelli, F. Piacenza, S. Strizzi, M. Provinciali, M. Malavolta // Chemosphere. – 2018. – V. 211. – P. 855–60. DOI 10.1016/j.chemosphere.2018.08.017.

194. Tang, W. Nephrotoxicity of cadmium-metallothionein: protection by zinc and role of glutathione / W. Tang, S. Sadovic, Z. A. Shaikh // Toxicol Appl Pharmacol. – 1998. – V. 151. – P. 276–82. DOI 10.1006/taap.1998.8465.

195. Wani, A.L. Influence of zinc levels on the toxic manifestations of lead exposure among the occupationally exposed workers / A. L. Wani, M. O. Ansari, M. F. Ahmad, N. Parveen, H. R. Siddique, G. G. H. A. Shadab // Environmental science and pollution research international. – 2019. – V. 26. – N. 32. – P. 33541–33554. DOI 10.1007/s11356-019-06443-w.
196. Vassilev, P.P. Changes in the contractile responses to carbachol and in the inhibitory effects of verapamil and nitrendipine on isolated smooth muscle preparations from rats subchronically exposed to Pb^{2+} and Zn^{2+} / P. P. Vassilev, K. Venkova, N. Pencheva, R. Radomirov, D. Staneva-Stoytcheva // Pharmacol Toxicol. – 1994. – V. 75. – N. 3-4. – P. 129–135. DOI 10.1111/j.1600-0773.1994.tb00335.x.
197. Willoughby, R.A. Lead and zinc poisoning and the interaction between Pb and Zn poisoning in the foal / R.A. Willoughby, E. MacDonald, B. J. McSherry, G. Brown // Canadian journal of comparative medicine: Revue canadienne de medecine compare. – 1972. – V. 36. – N. 4. – P. 348–359.
198. Chisolm Jr, J.J. Dose-effect and dose-response relationships for lead in children / J. J. Chisolm Jr, M. B. Barrett, E. D. Mellits // The Journal of pediatrics. – 1975. – V. 87. – P. 1152–1160. DOI 10.1016/s0022-3476(75)80130-2.
199. Wani, A.L. Influence of zinc levels on the toxic manifestations of lead exposure among the occupationally exposed workers / A. L. Wani, M. O. Ansari, M.F. Ahmad, M.F, N. Parveen, H. R. Siddique, G. G. H. A. Shadab // Environ Sci Pollut Res. – 2019. – V. 26. – P. 33541–33554. DOI 10.1007/s11356-019-06443-w.
200. Rink, L. Zinc and the immune system / L. Rink, P. Gabriel // Proc Nutr Soc. – 2000. – V. 59. – P. 541. DOI 10.1017/S0029665100000781.
201. Ranum, P. Zinc enrichment of cereal staples / P. Ranum // Food Nutr Bull. – 2001. – V. 22. – N. 2. – P. 169–172. DOI 10.1177/156482650102200207.

202. WHO Implementing the New Recommendations on the Clinical Management of Diarrhoea [электронный ресурс]. – World Health Organization. – 2006. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9241594217> (дата обращения: 15.04.2025).

203. Devarshi, P. P. Comparative Absorption and Bioavailability of Various Chemical Forms of Zinc in Humans: A Narrative Review / P. P. Devarshi, Q. Mao, R. W. Grant, S. Hazels Mitmesser // *Nutrients*. – 2024. – V. 16. – N. 24. – 4269. DOI 10.3390/nu16244269.

204. Hilty, F.M. Development and optimization of iron- and zinc-containing nanostructured powders for nutritional applications / F. M. Hilty, A. Teleki, F. Krumeich, R. Büchel, R. F. Hurrell, S. E. Pratsinis, M. B. Zimmermann // *Nanotechnology*. – 2009. – V. 20. – N. 47. – 475101. DOI 10.1088/0957-4484/20/47/475101.

205. Davidsson, L. Zinc absorption in adult humans: the effect of iron fortification / L. Davidsson, A. Almgren, B. Sandström, R. F. Hurrell // *The British journal of nutrition*. – 1995. – V. 74. – N. 3. – P. 417–425. DOI 10.1079/bjn19950145.

206. Marcovecchio, J.E. Fish and seafood. In: DeLaGuardia M, Garrigues S (eds). *Handbook of mineral elements in food* / J.E. Marcovecchio. – USA, 2015. DOI 10.1002/9781118654316.ch2715.

207. Brown, K.H. International zinc nutrition consultative group (izincg) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control // K. H. Brown, J. A. Rivera, Z. Bhutta, R. S. Gibson, J. C. King, B. Lönnerdal, M. T. Ruel, B. Sandtröm, E. Wasantwisut, C. Hotz // *Food Nutr Bull*. – 2004. – V. 25. – P. S99–S203.

208. Sandström, B. Zinc absorption from composite meals. II. Influence of the main protein source / B. Sandström, A. Cederblad // *Am J Clin Nutr*. – 1980. – V. 33. – P. 1778–1783. DOI 10.1093/ajcn/33.8.1778.

209. Solomons, N.W. Studies on the bioavailability of zinc in man. Iii. Effects of ascorbic acid on zinc absorption / N. W. Solomons, R. A. Jacob, O. Pineda, F. E. Viteri F.E. *Am J Clin Nutr*. – 1979. – V. 32. – P. 2495–2499. DOI 10.1093/ajcn/32.12.2495.

210. Sandstrom, B. Micronutrient interactions: Effects on absorption and bioavailability / B. Sandstrom // *Br J Nutr.* – 2001. – V. 85. – N. 2. – P. 181-185. DOI 10.1049/BJN2000312.

211. Wegmuller, R. Zinc absorption by young adults from supplemental zinc citrate is comparable with that from zinc gluconate and higher than from zinc oxide / R. Wegmuller, F. Tay, C. Zeder, M. Brnic, R. F. Hurrell // *J Nutr.* – 2014. – V. 144. – P. 132–136. DOI 10.3945/jn.113.181487.

212. Singh, P. Determination of ascorbic acid and its influence on the bioavailability of iron, zinc and calcium in Fijian foodsamples / P. Singh, S. Prasad // *Microchem J.* – 2018. – V. 139. – P. 119–124. DOI [10.1016/j.microc.2018.02.019](https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.02.019).

213. Zhang, W. Self-Powered Photoelectrochemistry Biosensor for Ascorbic Acid Determination in Beverage Samples Based on Perylene Material / W. Zhang, X. Sun, H. Liu, L. Shang, R. Ma, X. Li, L. Jia, S. He, C. Li, H. Wang // *Molecules.* – 2024. – V. 29. – N. 22. – 5254. DOI 10.3390/molecules29225254absorption.

214. Hu, Y. Organic zinc with moderate chelation strength enhances zinc absorption in the small intestine and expression of related transporters in the duodenum of broilers / Y. Hu, C. Wang, W. Wu, Y. Qu, W. Zhang, D. Li, L. Zhu, F. Gao, B. Wu, L. Zhang, X. Cui, T. Li, Y. Geng, X. Luo // *Front Physiol.* – 2022. – V. 13. – 952941. DOI 10.3389/fphys.2022.952941.

215. Schlegel, P. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ⁶⁵Zn labelled rats / P. Schlegel, W. Windisch // *J Anim Physiol Anim Nutr.* – 2006. – V. 90. – P. 216–222. DOI 10.1111/j.1439-0396.2005.00583.x.

216. Arshad, R. Nanotechnology: A novel tool to enhance the bioavailability of micronutrients / R. Arshad, L. Gulshad, I. U. Haq, M. A. Farooq, A. Al-Farga, R. Siddique, M. F. Manzoor, E. Karrar // *Food Sci Nutr.* – 2021. – V. 9. – N. 6. – P. 3354-3361. DOI 10.1002/fsn3.2311.

217. Wang, B. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice / B. Wang B, W. Y. Feng, T. C. Wang, G. Jia, M. Wang, J. W. Shi, F. Zhang, Y. L. Zhao, Z. F. Chai // *Toxicol Lett.* – 2006. – V. 161. – P. 115–123. DOI 10.1016/j.toxlet.2005.08.007.

218. Yang, Y. Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion / Y. Yang, C. Zhang, Z. Hu // *Environ Sci Process Impacts.* – 2013. – V. 15. – P. 39–48. DOI 10.1039/C2EM30655G.

219. Hidayat, C. Comparative effects of dietary zinc nanoparticle and conventional zinc supplementation on broiler chickens: A meta-analysis / C. Hidayat, S. Sadarman, D. N. Adli, R. K. Rusli, B. Bakrie, S. P. Ginting, S. A. Asmarasari, B. Brahmantiyo, A. Darmawan, H. Zainal, A. Fanindi, S. Rusdiana, I. Herdiawan, E. Sutedi, Y. R. Yanza, A. Jayanegara // *Veterinary world.* – 2024. – V. 17. – N. 8. – P. 1733–1747. DOI 10.14202/vetworld.2024.1733-1747

220. Rasmussen, J.W. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin* / J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, D. G. Wingett // *Drug Deliv.* – 2010. – V. 7. – P. 1063–1077. DOI 10.1517/17425247.2010.502560.

221. Anjum, S. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery and Treatment / S. Anjum, M. Hashim, S. A. Malik, M. Khan, J. M. Lorenzo, B. H. Abbasi, C. Hano // *Cancers (Basel).* – 2021. – V. 13. – N. 18. – 4570. DOI 10.3390/cancers13184570.

222. Chung, I. M. An investigation of the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Eclipta prostrata* on human liver carcinoma cells / I. M. Chung, A.A. Rahuman, S. Marimuthu, A. V. Kirthi, K. Anbarasan, G. Rajakumar // *Nanomaterials.* – 2015. – V. 5. – P. 1317–1330. DOI 10.3390/nano5031317

223. Mishra, P.K. Zinc oxide nanoparticles: A promising nanomaterial for biomedical applications / P. K. Mishra, H. Mishra, A. Ekielski, S. Talegaonkar, B. Vaidya // *Drug Discov Today.* – 2017. – V. 22. – P. 1825–1834. DOI 10.1016/j.drudis.2017.08.006.

224. Zhang, Z.Y. Photoluminescent ZnO nanoparticles and their biological applications / Z. Y. Zhang, H. M. Xiong // *Materials*. – 2015. – V. 8. – P. 3101–3127. DOI 10.3390/ma8063101.
225. Kim, S. Doxorubicin-wrapped zinc oxide nanoclusters for the therapy of colorectal adenocarcinoma / S. Kim, S. Y. Lee, H. J. Cho // *Nanomaterials*. – 2017. – V. 7. – 354. DOI 10.3390/nano7110354.
226. Wang, Y. Application of Chitosan-based Nanogel in Cancer Nanomedicine / Y. Wang, X. Lou, L. Yang, Y. Hou // *Current pharmaceutical design*. – 2025. – V. 31. – N. 16. – P. 1247 – 1258. DOI 10.2174/0113816128347060241105032329.
227. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.1.0004.15 «Атомно-эмиссионная спектрометрия». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
228. Chappuis, P. A sequential and simple determination of zinc, copper and aluminium in blood samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry / P. Chappuis, J. Poupon, F. Rousselet // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. – 1992. – V. 206. – N. 3. – P. 155–165. DOI 10.1016/0009-8981(92)90085-5.
229. Welz, B. Atomic Absorption Spectroscopy / B. Welz, B. VCH, Weinheim and Deerfield Beach, 1985. - 506 p.
230. Md Noh, M.F. Recent Techniques in Nutrient Analysis for Food Composition Database / M.F. Md Noh, R. D. Gunasegavan, N. Mustafa Khalid, V. Balasubramaniam, S. Mustar, A. Abd Rashed // *Molecules*. – 2020. – V.25. – N. 19. – 4567. DOI 10.3390/molecules25194567.
231. Nicolau, A. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment / A. Nicolau, N. Dias, M. Mota, N. Lima // *Research in microbiology*. – 2001. – V. 152. – N. 7. – P. 621–630. DOI 10.1016/s0923-2508(01)01241-4.

232. Pauli, W. A case for the inclusion of a protozoan test in aquatic toxicity assessment using *Tetrahymena* / W. Pauli, S. Berger, L. Jaskulka, S. Schmitz // *Sci Total Environ Suppl.* – 1993. – V. 1. – P. 779–786. DOI: 10.1016/s0048-9697(05)80082-8.
233. Mortimer, M. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* / M. Mortimer, K. Kasemets, A. Kahru // *Toxicology.* – 2010. – V. 269. – N. 2-3. – P. 182–189. DOI 10.1016/j.tox.2009.07.007.
234. Madoni, P. Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants / P. Madoni, D. Davoli, G. Gorbi // *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* – 1994. – V. 53. – N. 3. – P. 420–425. DOI 10.1007/BF00197235
235. Madoni, P. Toxic effects of heavy metals on the activated sludge protozoan community / P. Madoni, D. Davoli, G. Gorbi, L. Vescovi // *Water Res.* – 1996. – V. 30. – P. 135–141. DOI 10.1016/0043-1354(95)00124-4.
236. Domingo, J.L. Acute zinc intoxication: Comparison of the antidotal efficacy of several chelating agents / J. L. Domingo, J. M. Llobet, J. L. Paternain, J. Corbella // *Vet Hum Toxicol.* – 1988. – V. 30. – N. 3. – P. 224–228.
237. Maita, K. Subacute toxicity studies with zinc sulfate in mice and rats / K. Maita, M. Hirano, K. Mitsumori, K. Takahashi, Y. Shirasu // *J Pest Sci.* – 1981. – V. 6. – N. 3. – P. 327–336. DOI 10.1584/jpestics.6.327.
238. Lansdown, A.B. Interspecies variations in response to topical application of selected zinc compounds / A. B. Lansdown // *Food Chem Toxicol.* – 1991. – V. – N. 1. – P. 57–64. DOI 10.1016/0278-6915(91)90063-d.
239. Allen, J.G. Zinc toxicity in ruminants / J. G. Allen, H. G. Masters, R. L. Peet, K. R. Mullins, R. D. Lewis, S. Z. Skirrow, J. Fry // *J Comp Pathol.* – 1983. – V. 93. – N. 3. – P. 363–377. DOI 10.1016/0021-9975(83)90024-5.

240. Shah, P. Role of caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption / P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi, A. Misra // *Biotechnol Prog.* – 2006. – V. 22. – N. 1. – P. 186–198. DOI 10.1021/bp050208u.

241. Laparra, J.M. Purified glycosaminoglycans from cooked haddock may enhance Fe uptake via endocytosis in a caco-2 cell culture model / J. M. Laparra, R. Barbera, A. Alegria, R. P. Glahn, D. D. Miller // *J Food Sci.* – 2009. – V. 74. – P. H168–H173. DOI 10.1111/j.1750-3841.2009.01216.x.

242. Jovani, M. Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by caco-2 cells / M. Jovaní, R. Barberá, R. Farré, E. Martín de Aguilera // *J Agric Food Chem.* – 2001. – V. 49. – N. 7. – P. 3480–3485. DOI 10.1021/jf010106t.

243. Corti, G. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption ii. Demonstration of the method suitability / G. Corti, F. Maestrelli, M. Cirri, N. Zerrouk, P. Mura // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – V. 27. – P. 354–362. DOI 10.1016/j.ejps.2005.11.005.

244. Delie, F. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the caco-2 model / F. Delie, R. Werner // *Crit Rev Ther Drug Carr Syst.* – 1997. – V. 14. – P. 221–286. DOI 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v14.i3.20.

245. Kurniawan, I. Implementation of ensemble methods on QSAR Study of NS3 inhibitor activity as anti-dengue agent / I. Kurniawan, M. Rosalinda, N, Ikhsan // *SAR QSAR Environ Res.* – 2020. – V. 31. – N. 6. – P. 477–492. DOI 10.1080/1062936X.2020.1773534

246. Verma, R.P. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs / R. P. Verma, C. Hansch // *Bioorganic & medicinal chemistry.* – 2007. – V. 15. – N. 6. – P. 2223–2268. DOI 10.1016/j.bmc.2007.01.011.

247. Poola, A.A. Ligand-based pharmacophore modeling and QSAR approach to identify potential dengue protease inhibitors / A. A. Poola, P.S. Prabhu, T. P. K. Murthy, M.

Murahari, S. Krishna, M. Samantaray, A. Ramaswamy // Front Mol Biosci. – 2023. – V. 10. – 1106128. DOI 10.3389/fmolb.2023.1106128.

248. Gupta, S. P. Quantitative structure-activity relationship studies on zinc-containing metalloproteinase inhibitors / S. P. Gupta S. P. // Chemical reviews. – 2007. – V. 107. – N. 7. – P. 3042–3087. DOI 10.1021/cr030448t.

249. Marukhlenko, A. V. Chelation of Zinc with Biogenic Amino Acids: Description of Properties Using Balaban Index, Assessment of Biological Activity on *Spirostomum Ambiguum* Cellular Biosensor, Influence on Biofilms and Direct Antibacterial Action / A. V. Marukhlenko, M. A. Morozova, A. M. J. Mbarga, N. V. Antipova, A. V. Syroeshkin, I. V. Podoprigora, T. V. Maksimova, T. V. // Pharmaceuticals. – 2022. – V. 15. – N. 8. – 979. DOI 10.3390/ph15080979

250. Успенская, Е.В. Методы лазерного светорассеяния в контроле качества водных растворов фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ: дис. ... д-ра фарм. наук: 14.04.02 / Успенская Елена Валерьевна. – М., 2018. –113.

251. Nałecz-Jawecki, G. Spirotox-*Spirostomum ambiguum* acute toxicity test-10 years of experience / G. Nałecz-Jawecki // Environ Toxicol. – 2004. – V. 19. – N. 4. – P. 359—64. DOI 10.1002/tox.20023.

252. Nałecz-Jawecki, G. Influence of Selected Antidepressants on the Ciliated Protozoan *Spirostomum ambiguum*: Toxicity, Bioaccumulation, and Biotransformation Products / G. Nałecz-Jawecki, M. Wawryniuk, J. Giebułtowicz, A. Olkowski, A. Drobniewska // Molecules. – 2020. – V. 25. – N. 7. – 1476. DOI 10.3390/molecules25071476.

253. Nałecz-Jawecki, G. Influence of pH on the toxicity of nitrophenols to Microtox® and Spirotox tests / G. Nałecz-Jawecki, J. Sawicki // Chemosphere. – 2003. – V. 52. – N. 1. – P. 249-252. DOI 10.1016/s0045-6535(02)00865-2.

254. Ковалева А.А. Клетка как химический реактор: аррениусовская зависимость ДМСО-индуцируемой кинетики гибели инфузории *Spirostomum ambigua* от

температуры / А.А. Ковалева, Т.В. Плетенева, О.Б. Серегина, А.В. Сыроешкин // Электронный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ». – 2001. – № 113. – С. 1115-1124.

255. Быканова, С. Н. Использование клеточного биосенсора *Spirostomum ambigua* для характеристики биологической активности компонентов фармацевтических препаратов / С. Н. Быканова, О. С. Суздалева, О. Б. Серегина, А.А. Ковалева, И.А. Комиссарова, Т.В. Плетенева, А.В. Сыроешкин // Электронный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ». – 2003. – Р. 1114–1129.

256. Goncharuk, V.V. Quasichemical Description of the Cell Death Kinetics of Cellular Biosensor *Spirostomum Ambigua* for Testing the Biological Activity of Aqueous Solutions / V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, I.A. Zlatkiy, E.V. Uspenskaya, A.V. Orekhova, O.V. Levitskaya, V.I. Dobrovolskiy, T.V. Pleteneva // Journal of Water Chemistry and Technology. – 2017. – V. 39. – N. 2. – P. 97–102.

257. Рашкес, Я.В. Об основах применения инфракрасной спектроскопии в органической химии / Я.В. Рашкес, – Ташкент : Изд-во АН Узбекской ССР, 1963. -56 с.

258. Goncharuk, V.V. On the possibility of chiral structure-density submillimeter inhomogeneities existing in water / V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, E. V. Uspenskaya, O. V. Levitskaya, V. A. Tverdislov // J. Water Chem. Technol. – 2017. – N. 39. – P. 319–324. DOI: 10.3103/S1063455X17060029.

259. The European Chemicals Agency. Zinc Sulfate [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15488/7/3/1>.

260. Сыроешкин, А.В. Лекарственные препараты на основе релиз-активных антител / А.В. Сыроешкин, М.В. Никифорова, А.М. Колдина // Справочник поликлинического врача. – 2018. – N. 3. – С. 25–30.

261. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 3. ФС.2.2.0036.18 «Цинка сульфат гептагидрат». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

262. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

263. Lewis, G. N. The Activity Coefficient of Strong Electrolytes / G. N. Lewis, M. Randall // Journal of the American Chemical Society. – 1921. – V. 43. – N. 5. – P. 1112-1154.

264. Li, G. Elemental impurities in pharmaceutical excipients / G. Li, D. Schoneker, K.L. Ulman, J.J. Sturm, L.M. Thackery, J.F. Kauffman // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104. – N 12. – P. 4197-4206. DOI: 10.1002/jps.24650.

265. Hineman, A. Determination of Elemental Impurities in Antacids by ICP-MS According to the Validation Protocols Defined in USP Chapters <232> and <233> and ICH Q3D Step 4 Guidelines / A. Hineman // Spectrosc. – 2017. – V. 32. – N 7. – P. 36-40.

266. Костыгина, М.Н. Определение содержания цинка в биологически активной добавке методом рентгенофлуоресцентного анализа / М.Н. Костыгина, А.В. Сыроешкин, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенева // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19. – N 7. – С. 156–159.