

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ НАКОПЛЕНИЯ ЦИНКА ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ $Zn(OH)_2$ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO © Ларин С.Л.¹, Будко Е.В.¹, Хабаров А.А.¹, Липатов В.А.², Звягинцева А.Р.²¹ Кафедра общей и биоорганической химии, ² кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии Курского государственного медицинского университета, КурскE-mail: sergeilarin.kursk@gmail.com

Проведено экспериментальное исследование динамики накопления цинка в течение 168 часов в плазме крови, эритроцитарной массе и печени крыс Wistar. Для изучения были выбраны малоразмерные соединения, полученные модифицированным конденсационным методом: $Zn(OH)_2$ (2-3 нм), ZnO (0,9 – 1 мкм), в качестве соединения-сравнения – $ZnSO_4$. Препараты вводились крысам энтерально в концентрации 100 мг/кг в пересчете на цинк. Выявлена лучшая (в 1,5-2 раза по сравнению с $ZnSO_4$ и ZnO) динамика накопления Zn для гидроксида цинка в эритроцитарной массе. Показана способность наночастиц $Zn(OH)_2$ к более быстрому проникновению в плазму крови. Уровень цинка, определенный в тканях печени группы получавшей $Zn(OH)_2$, достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группах, где вводились ZnO и $ZnSO_4$. Сделан вывод о потенциальной эффективности наночастиц гидроксида цинка в качестве перспективного соединения для использования в биофармацевтических целях.

Ключевые слова: наночастицы, микрочастицы, оксид цинка, гидроксид цинка, крысы Wistar, атомно-адсорбционная спектроскопия.

EXPERIMENTAL STUDY OF ZINC ACCUMULATION DYNAMICS IN INTRAGASTRIC ADMINISTRATION OF $Zn(OH)_2$ NANOPARTICLES AND ZnO MICROPARTICLESLarin S.L.¹, Budko E.V.¹, Khabarov A.A.¹, Lipatov V.A.², Zvyagintseva A.R.²¹ Department of General and Bioorganic Chemistry, ² Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy of Kursk State Medical University, Kursk

An experimental study of the dynamics of zinc accumulation within 168 hours in blood plasma, packed red blood cells, and liver of Wistar rats was conducted. The study included small-sized compounds that had been prepared by the modified condensation method: $Zn(OH)_2$ (2-3 nm), ZnO (0.9 - 1 μ m), and as a comparative compound - $ZnSO_4$. The substances were administered to rats intragastrically at dosage 100 mg/kg in terms of zinc. The study revealed the best dynamics (1.5-2 times as compared with $ZnSO_4$ and ZnO) of zinc hydroxide accumulation in packed red blood cells. The ability of zinc hydroxide nanoparticles to more rapid penetration into blood plasma was revealed. Zinc levels in liver tissue of the group having received $Zn(OH)_2$ was significantly lower ($p < 0.05$) as compared to the groups which had been administered ZnO and $ZnSO_4$. We concluded that nano $Zn(OH)_2$ is of great potential efficacy as a perspective compound in biopharmaceutical applications.

Keywords: nanoparticles, microparticles, zinc oxide, zinc hydroxide, Wistar rats, atomic absorption spectrometry.

Адекватный уровень поступления цинка в организме человека имеет важное значение для нормального течения процессов роста, функционирования иммунитета, работы нервной и репродуктивной системы. Важное влияние Zn на процессы метаболизма обусловлено большим количеством цинк-зависимых ферментов, известное количество которых на сегодняшний день не менее 3000. По некоторым оценкам, в мире более 2 млрд людей имеют один и более хронических микроэлементозов, из которых более чем у 1,1 млрд диагностированы цинкдефицитные состояния [15]. Важным фактором остается то, что недостаток цинка, как микронутриента, возникает не из-за недостаточного поступления с пищей, а вследствие малой биодоступности из продуктов питания. Для коррекции дефицита Zn целесообразно использовать его дополнительные источники, представляющие собой, чаще всего, органические и неорганические соли цинка.

Большое количество исследований, направленных на поиск препаратов, обладающих повышенной биологической доступностью, сконцентрированы на исследовании органических соединений [1, 18]. В то же время введение неорганических веществ, измельченных до частиц нано- и микро размеров, существенно изменяют отклик организма. Известно, что активность частиц может зависеть от геометрической формы, морфологии и устойчивости полученного наноразмерного (микроразмерного) соединения [19, 13]. Прогнозирование свойств таких материалов в отношении живого организма не всегда возможно, поэтому актуальной задачей является оценка биологической активности в эксперименте *in vivo*.

Исследования микро- и наноразмерных неорганических соединений цинка чаще всего проводятся с применением диспергированного оксида цинка. По данным [6], наночастицы ZnO

обладают повышенной биологической доступностью. Способствует этому высокий порог токсичности – сообщается о токсической концентрации наночастиц ZnO (размером 20 и 70 нм) для крыс в дозе 2000 мг/кг [8]. Такой высокий уровень токсичности свидетельствует о биологической реакции, вызванной наноразмерным оксидом цинка, которая также может являться свидетельством повышенной доступности мало-размерных форм для организма.

Представляет интерес поиск и исследование новых соединений цинка, обладающих биологической активностью (параметрами всасываемости, накопления и биораспределения в тканях и органах) при минимальных токсических проявлениях.

Целью работы являлось экспериментальное исследование динамики накопления цинка в плазме, эритроцитарной массе и печени крыс при энтеральном введении наночастиц Zn(OH)₂ и микрочастиц ZnO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее нами было проведено сравнительное изучение 6 соединений различной степени дисперсности и морфологии поверхности на тест-культуре *S. cerevisiae* [4], которое показало высокую биологическую активность малорастворимых диспергированных соединений. Для исследования *in vivo* использованы: наноразмерный гидроксид цинка (далее – Zn-NP), микроразмерный оксид цинка (далее – Zn-MP) и промышленный образец сульфата цинка (ХЧ, ГОСТ 4174-77), представляющий собой бесцветные кристаллы, растворимые в воде. Наночастицы гидроксида цинка были получены модифицированным конденсационным методом путем реакции между гидроксидом лития и ацетатом цинка в среде абсолютного этанола при пониженной температуре с последующим центрифугированием. Распределение частиц по размеру в геле было исследовано методом малоуглового рентгеновского рассеяния на рентгенфлуоресцентном спектрометре EDX-800HS (Shimadzu, Япония) и показало размерность частиц 2-3 нм [2]. Геометрическая структура частиц показала бипирамидальную форму. Микрочастицы оксида цинка были получены отжигом соединения Zn-NP при 600°C без предварительного высушивания. Анализ размера и морфологии проведен методом сканирующей электронной микроскопии на электронном микроскопе 6610LV (JEOL, Япония). Измерения позволили выявить средний размер частиц – 0.955 мкм и преобладающую гексагональную сингонию кристаллов [2]. Для исследуемых образцов также было проведено

изучение методом рентгенофазового анализа, которое не выявило никаких значимых примесей.

Исследование было проведено на базе лаборатории доклинических исследований лекарственных средств НИИ Экологической медицины. В качестве тест-животных в исследовании были использованы инбредные белые крысы-самцы Wistar. Возраст составлял 10 недель на момент эксперимента. Крысы были отобраны по массе тела в диапазоне 120-150 г. Животные содержались в пластиковых клетках в вентилируемом помещении, где также поддерживались оптимальные параметры микроклимата: температура 20°C ± 2°C и влажность 60% ± 10%. Был организован искусственный 12-часовой световой день. До эксперимента и во время его крысы получали рацион вивария: стандартный экструдированный гранулированный полнорационный комбикорм для лабораторных животных ПК-120 (ГОСТ Р 51849-2001) и питьевую профильтрованную воду в количестве *ad libitum*. Перед началом манипуляций была проведена акклиматизация лабораторных животных в течение 7 дней. Исследование было запланировано и проведено в соответствии с требованиями РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств», а также с учетом рекомендаций Federation of Laboratory Animal Science Associations [11]. Операции и все манипуляции с животными проводились с учетом положений, регламентируемых СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г [6].

Для проведения эксперимента животные были разделены на четыре группы (n=6 в группе). Первая группа (Zn-NP) получала наночастицы гидроксида цинка, вторая группа (Zn-MP) получала микрочастицы оксида цинка и животным третьей группы вводилось соединение сравнения – сульфат цинка. Четвертая группа являлась контрольной, в которой крысы получали дистиллированную воду.

На основании литературных данных была определена минимальная доза соединения цинка, оказывающая терапевтический эффект, которая составила 100 мг/кг [7, 8, 9, 12].

Для соединений Zn-NP и Zn-MP перед дозированием готовилась суспензия в дистиллированной воде, которая находилась при постоянном перемешивании. Образцы сульфата цинка были легко растворимы в воде и применялись в виде раствора. Введение крысам происходило энтерально под эфирным наркозом с использованием зонда. Животные получали исследуемое соединение один раз в день по схеме: 0 – 24 – 48 – 72 – 120 – 168 часов.

После введения испытуемым животным соединений Zn-NP, Zn-MP и ZnSO₄ регистрировалась масса тела, внешние морфологические и физиологические признаки, параметры поведения.

Не было отмечено случаев гибели животных, каких-либо атипичных проявлений поведения, изменений волосяного и кожного покрова.

Спустя 4 часа после введения субстанции, у животного под эфирным наркозом получали образец крови из яремной вены, а затем, после умерщвления – образцы печени.

Для предварительной пробоподготовки к определению концентрации Zn^{2+} использовался метод «мокрого озоления» в хлорной кислоте при температуре 200-205°C в течение 1,5-2 ч. до образования влажных солей. Затем добавляли пергидроль и повторяли нагревание. Завершение процесса пробоподготовки определяли визуально по изменению цвета минерализата до прозрачного.

Для пробоподготовки фракций крови предварительно в течение 15 мин было проведено центрифугирование при температуре 4°C, количество оборотов – 3000 об/мин.

Полученные минерализаты переносились в мерную колбу на 25 мл, разбавлялись дистиллированной водой и передавались для количественного анализа.

Определение концентрации цинка в минерализатах производилось методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрометре СПЕКТР-5-4 (ОАО «СОЮЗЦВЕТМЕТАВТОМАТИКА», Россия, номер в Государственном реестре средств измерений 13743-04). В процессе подготовки к анализу были выбраны оптимальные характеристики работы прибора: ширина щели – 0,25 П мм., резонансная линия – 213,9 нм., амплитуда импульсов тока – $I_1 = 15$ мА, $I_2 = 200$ мА., тип пламени – ацетилен-воздух.

Перед началом работы оборудование калибровалось по 7 концентрационным точкам ($C_{Zn^{2+}}$ от 0,001 до 3,000 мг/дм³). Растворы для калибровки готовились из государственных стандартных образцов цинка с концентрацией 1 г/дм³ (ООО «Центр стандартных образцов и высокочистых веществ», Россия).

Результаты исследования были обработаны с применением методов описательной и вариационной статистики. Для характеристики показателей рассчитывали среднюю арифметическую, моду, медиану, стандартное отклонение средней арифметической, среднюю ошибку средней арифметической. Все данные представлены как «значение средней арифметической ± стандартное отклонение». Для определения статистической значимости отличия средних величин между экспериментальными группами использовали критерий Манна-Уитни. Существенными считали отличия при показателе $p \leq 0,05$. Данные обрабатывали при помощи программ STATISTICA (StatSoft, США) и OriginPro 9.2 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика накопления цинка в плазме крови имеет сходную картину для всех трех групп: наблюдается достоверный рост концентрации ($p < 0,05$), который сменяется снижением уровня Zn^{2+} на 120-й час (период отмены), и после возобновления приема соединения вновь возрастает. Динамика накопления цинка в плазме крови представлена на рисунке 1.

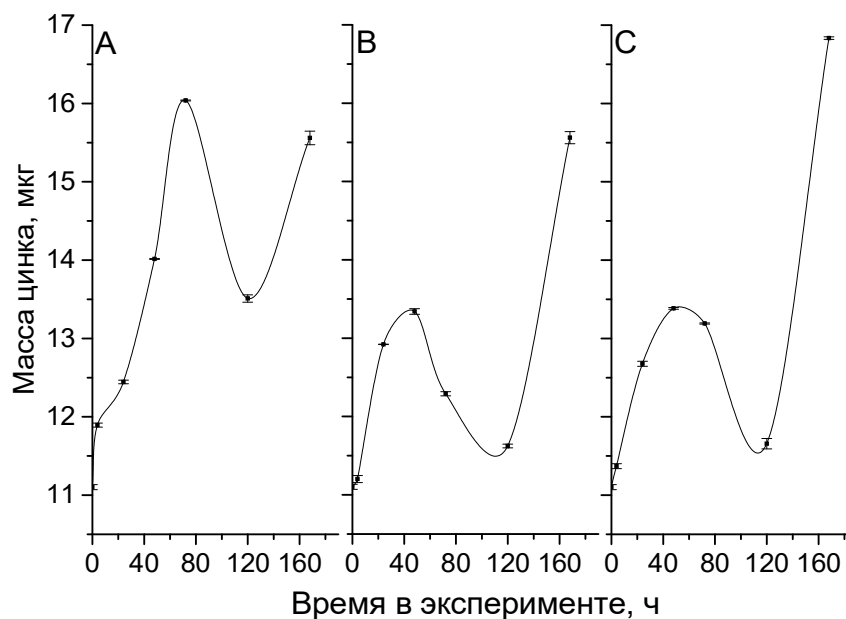


Рис. 1. Динамика накопления Zn^{2+} (мкг) в плазме крови крыс: А. Группа, получавшая наноразмерный гидроксид цинка. В. Группа, получавшая микроразмерный оксид цинка. С. Группа, получавшая сульфат цинка.

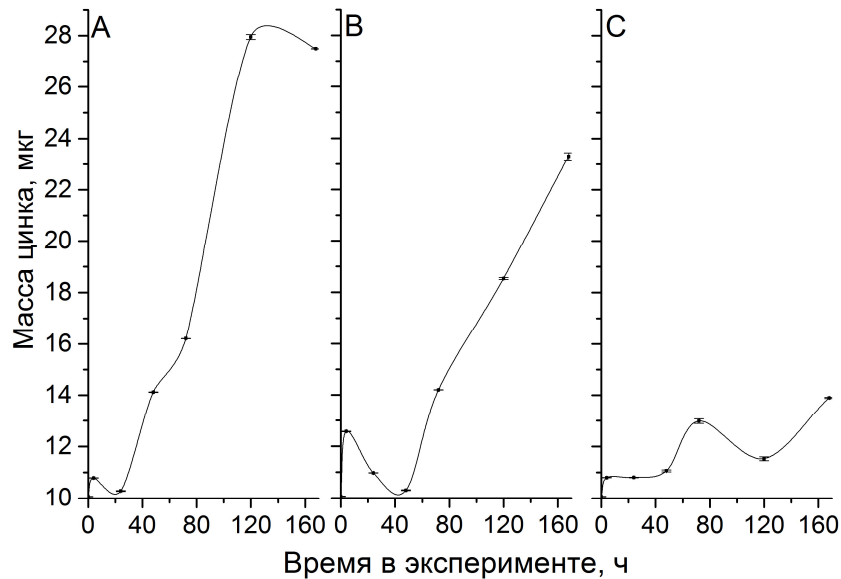


Рис. 2. Динамика накопления Zn^{2+} (мкг) в эритроцитарной массе крови крыс: А. Группа, получавшая наноразмерный гидроксид цинка. В. Группа, получавшая микроразмерный оксид цинка. С. Группа, получавшая сульфат цинка.

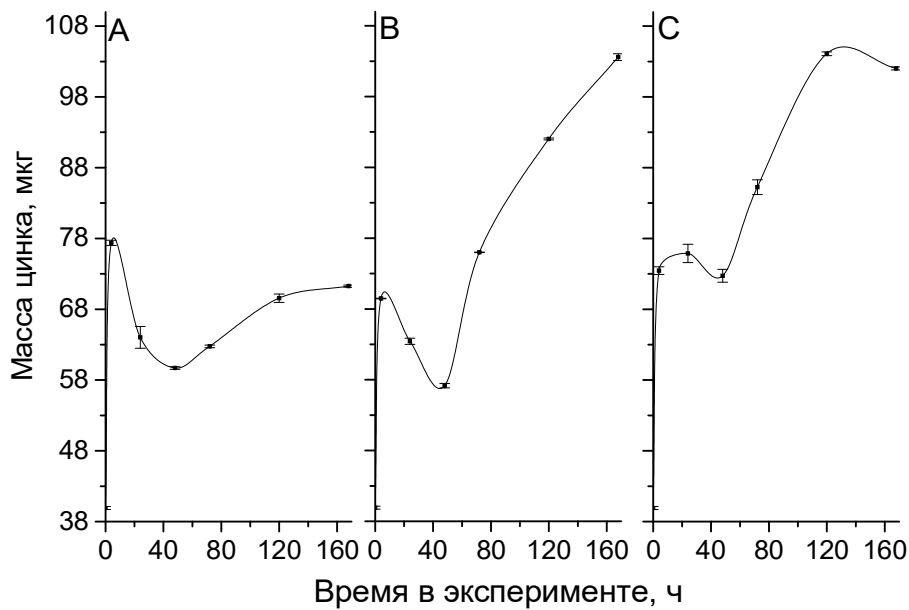


Рис. 3 Динамика накопления Zn^{2+} (мкг) в печени крыс: А. Группа, получавшая наноразмерный гидроксид цинка. В. Группа, получавшая микроразмерный оксид цинка. С. Группа, получавшая сульфат цинка.

Подобный эффект демонстрирует высокую скорость перераспределения цинка, находящегося в избытке в плазме, в другие органы. Для группы Zn-NP снижение уровня цинка в период отмены минимальный ($13,51 \pm 0,05$ мкг), в то время как в группах Zn-MP и ZnSO₄ показатель концентрации Zn^{2+} ($11,62 \pm 0,02$ и $11,65 \pm 0,06$ мкг) практически возвращается к значениям контрольной группы ($11,1 \pm 0,1$ мкг). После возобновления приема соединений во всех трех группах вновь обнаруживается рост концентрации цинка, к концу эксперимента составивший $15,60 \pm 0,08$ мкг,

$15,56 \pm 0,08$ мкг и $16,83 \pm 0,02$ мкг для групп Zn-NP, Zn-MP и ZnSO₄ соответственно.

На рисунке 2 представлены экспериментальные данные по содержанию цинка в эритроцитарной массе.

В группах Zn-NP и Zn-MP наблюдается значительное увеличение концентрации цинка в эритроцитарной массе уже после второго приема соединения ($16,21 \pm 0,01$ мкг и $14,19 \pm 0,01$ мкг соответственно для Zn-NP и Zn-MP, по сравнению с $10,07 \pm 0,01$ в контрольной группе) и отсутствие снижения концентрации к 120-му часу (в период перерыва). Характер изменения уровня

цинка в эритроцитарной массе при введении растворимого $ZnSO_4$ статистически значимо ($p < 0,05$) различается между каждой из групп, уменьшаясь в ряду $Zn-NP - Zn-MP - ZnSO_4$. Для сульфата цинка обнаружена сравнительно низкая способность к накоплению в эритроцитарной массе. Так, к 7 дню эксперимента масса Zn^{2+} выросла всего на $3,82 \pm 0,14$ мкг. В группе $ZnSO_4$ наблюдается характерное снижение концентрации цинка до $11,53 \pm 0,07$ мкг в эритроцитарной массе при 120 часах (в период перерыва), при возобновлении введения соединения это значение вновь растет и к концу эксперимента составляет $13,89 \pm 0,01$ мкг. В группах, получавших наночастицы $Zn(OH)_2$ и ZnO , эти значения составляют $27,49 \pm 0,01$ мкг и $23,31 \pm 0,02$ мкг соответственно.

Содержание ионов цинка в печени крыс после введения наноразмерного гидроксида цинка, микроразмерного оксида цинка и сульфата цинка при сопоставлении между группами имеют достоверное ($p < 0,05$) различие и представлено на рисунке 3.

Анализ данных в группе животных, получавших наночастицы $Zn(OH)_2$, показывает малый уровень бионакопления цинка в тканях печени – к концу эксперимента было обнаружено $71,26 \pm 0,21$ мкг, в то время, как в контрольной группе содержание Zn составило $39,92 \pm 0,22$ мкг. У животных, получавших микрочастицы ZnO и $ZnSO_4$, установлено значение уровня цинка в тканях печени $103,58 \pm 0,48$ мкг и $102,02 \pm 0,21$ мкг соответственно.

При сопоставлении начального этапа (0-48 ч) накопление соединений в группах $Zn-NP$ и $Zn-MP$ статистически незначимо ($p > 0,05$) и его уровень достоверно отличается ($p < 0,05$) только начиная с 72 часов. При сравнении заключительного этапа (72-168 ч) наблюдается обратная ситуация: между группами, получавшими ZnO и $ZnSO_4$, не имеется достоверного различия ($p > 0,05$), в то время как между ними и группой $Zn-NP$ статистически значимое ($p < 0,05$) отличие присутствует. В период перерыва введения соединений (120 ч) ни в одной из трех групп не обнаружено снижения уровня цинка в тканях печени.

Для наночастиц цинка, попавших в желудочно-кишечный тракт, могут быть выделены следующие дальнейшие пути: взаимодействие с кислой средой желудка и дальнейшая биоабсорбция в виде ионов либо всасывание в неизменном виде. Авторы [8] описывают процесс всасывания наночастиц ZnO размером 20 и 70 нм, как растворение в желудочном соке с последующим образованием связей $Zn-S$. Авторы [21] также сообщают о растворении частиц оксида цинка размером 30 нм

с последующими проявлениями токсичности, характерными для растворимого $ZnCl_2$. Характер изменения концентрации цинка в плазме крови групп, получавших наночастицы $Zn(OH)_2$ и микрочастицы ZnO , имеет статистически достоверное различие ($p < 0,05$), что указывает на отличие в механизме транспорта через эпителий кишечника. Это также согласуется с литературными данными, авторами [10] показана способность эпителиальных клеток кишечника регулировать абсорбцию наночастиц до 3 нм в диаметре. Кроме того, в работе [3] показано в эксперименте, что наночастицы ZnO размером 30 нм не претерпевают значительных химических превращений, что позволяет находиться им в неизменном виде в кровяном русле.

В течение всех 168 часов уровни концентрации Zn^{2+} в плазме крови достоверно выше ($p < 0,05$) для малорастворимого гидроксида цинка в сравнении с растворимым $ZnSO_4$. В то же время изменение уровня цинка в плазме для групп $Zn-MP$ и $ZnSO_4$ не имеет достоверного различия ($p > 0,05$). Поскольку массы вводимых крысам соединений были эквивалентны по содержанию цинка, то можно определить, что механизм транспорта цинка в группах $Zn-NP$ и $ZnSO_4$ происходит по типу перехода в ионную форму в ЖКТ с последующим образованием цинк-сульфидных связей и транспортом при помощи цинк-селективных металлотионеинов. Для наноразмерного гидроксида цинка такой процесс затруднителен из-за размера и пространственного строения коллоидной мицеллы, окруженной стабилизирующей оболочкой из адсорбированных ионов и молекул растворителя, что позволяет ему переходить в тонкий кишечник в неизменном виде, где $Zn-NP$ абсорбируется либо по типу трансцеллюлярного транспорта, либо по типу парацеллюлярного транспорта.

Высокий уровень накопления цинка в эритроцитарной массе в группах $Zn-NP$ и $Zn-MP$ обусловлен размером частиц. Сравнительно низкая доступность микро- и наночастиц в кишечнике (за период 0-24-48 часов в эритроцитарной массе накопилось $4,03 \pm 0,04$ мкг и $0,90 \pm 0,05$ мкг соответственно для групп $Zn-NP$ и $Zn-MP$) компенсируется формированием устойчивого пула цинка на внутренней поверхности кишечной стенки. Эта гипотеза согласуется с литературными данными – авторы [14] сообщают о повреждениях ткани кишечника крыс из-за обширных отложений наноразмерного оксида цинка (100 нм), введенного энтерально. Кроме этого, малоразмерные соединения способны и к адгезии на поверхности эритроцитов, таким образом формируя еще один

источник постоянного поступления цинка в самом кровяном русле. Об этом сообщается в работе [20], где авторами обнаружено явление адсорбции наночастиц оксида цинка (431 нм) на поверхности эритроцитарной мембраны в экспериментальном исследовании на крысах.

Способность наночастиц к накоплению в печени известна и описана в литературе, так в [16] показано, что введенные энтерально наночастицы оксида цинка (35 нм) после попадания в кровяное русло в основном аккумулируются в печени. Авторы [17] также описывают, что введенные наночастицы размером 100 нм имеют тенденцию к накоплению в печени, что при высоких дозах приводит к токсическим поражениям. Введенные микрочастицы ZnO, как и сульфат цинка, формируют пул в печени, который не уменьшается при прекращении введения крысам исследуемого вещества. Такой эффект объясняется сходным механизмом биоабсорбции ZnO и ZnSO₄, которые поступают в печень в виде комплекса из цинкselectивного металлотеонинина и иона цинка. Дальнейшие длительные процессы биотрансформации способствуют формированию пула цинка в тканях печени. Существенным преимуществом наноразмерного гидроксида цинка может стать его способность к малому, сравнительно с традиционной формой (сульфат цинка) и микроразмерной формой (оксид цинка), накоплению в тканях печени. По-видимому, такое действие наночастиц Zn(OH)₂ связано с особенностями их всасывания и транспорта.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

Характер всасывания в плазму крови крыс наноразмерного Zn(OH)₂ (2-3 нм), введенного энтерально в дозе 100 мг/кг, отличается от всасывания микроразмерного ZnO (0,9 мкм) и растворимого ZnSO₄, характеризуется высокой скоростью на начальном этапе (0-72 ч) и количественно составляет к 72 ч 16,04±0,01 мкг по сравнению с 12,91±0,03 мкг и 13,19±0,07 мкг для ZnO и ZnSO₄ соответственно.

Отмечен достоверно (p<0,05) максимальный среди исследованных веществ уровень накопления наноразмерного гидроксида цинка в эритроцитарной массе, составивший 27,48±0,01 мкг.

Уровень цинка в тканях печени животных, получавших Zn(OH)₂, достоверно ниже к 168 часам (p<0,05), чем в группах, где вводились ZnO и ZnSO₄.

Показано, что наночастицы гидроксида цинка обладают более интенсивной динамикой

накопления в крови, чем традиционное растворимое соединение ZnSO₄.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баяржаргал М., Мазо В.К., Гмошинский И.В., Зорин С.Н., Зилова И.С., Шевякова Л.В., Махова Н.Н., Ширина Л.И. Изучение биодоступности нового пищевого источника цинка // Вопросы детской диетологии. – 2007. – № 2. – С. 11-15.
2. Будко Е.В., Хабаров А.А., Ларин С.Л. Синтез и характеристика малоразмерных соединений цинка для коррекции гипопинкозов // Перспективные материалы. – 2016. – № 3. – С. 41-46.
3. Котенко К.В., Беляев И.К., Бузулуков Ю.П., Бушманов А.Ю., Демин В.Ф., Жорова Е.С., Калистратова В.С., Марченков В.С., Нисимов П.Г., Распопов Р.В., Соловьев Е.Ю. Экспериментальное исследование биокинетики наночастиц оксида цинка у крыс после однократного перорального введения с использованием технологии меченых атомов // Радиационная биология. – 2011. – № 2. – С. 5-10.
4. Ларин С.Л., Будко Е.В., Хабаров А.А. Влияние наноразмерных соединений цинка на подъемную силу тест-культуры *Saccharomyces cerevisiae* // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 5. – С. 180-185.
5. Распопов Р.В., Бузулуков Ю.П., Марченков Н.С., Соловьев В.Ю., Демин В.Ф., Калистратова В.С., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Биодоступность наночастиц оксида цинка. Изучение методом радиоактивных индикаторов // Вопросы питания. – 2010. – № 6. – С. 14-18.
6. СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [Электронный ресурс] // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=3521, свободный (29.05.2016).
7. Тутельян В.А. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ: методические рекомендации МР 2.3.1.1915-04. – М.: Федеральный центр госэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 46 с.
8. Baek M., Chung H.E., Yu J., Lee J.A., Kim T.H., Oh J.M., Lee W.J., Paek S.M., Lee J.K., Jeong J., Choy J.H., Choi S.J. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles // International Journal of Nanomedicine. – 2012. – Vol. 7. – P. 3081-3097. – doi: 10.2147/IJN.S32593.
9. Cho W.S., Kang B.C., Lee J.K., Jeong J., Che J.H., Seok S.H. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration // Particle and toxicology. – 2013. – Vol. 10. – P. 1-9. – doi: 10.1186/1743-8977-10-9.
10. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions // Cold Spring Harbor Perspectives in

- Biology. – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 1-18. – doi: 10.1101/cshperspect.a002907.
11. Guillen J. FELASA guidelines and recommendations // Journal of the American association for laboratory animal science. – 2012. – Vol. 51, N 3. – P. 311-321.
 12. Hong J.S., Park M.K., Kim M.S., Lim J.H., Park G.J., Maeng E.H., Shin J.H., Kim M.K., Jeong J., Park J.A., Kim J.C., Shin H.C. Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats // International Journal of Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9, Supp. 2. – P. 159-171. – doi: 10.2147/IJN.S57932
 13. Jiang J., Oberdörster G., Elder A., Gelein R., Mercer P., Biswas P. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? // Nanotoxicology. – 2008. – Vol. 2, N 1. – P. 33-42.
 14. Ko J.W., Hong E.T., Lee I.C., Park S.H., Park J.I., Seong N.W., Hong J.S., Yun H.I., Kim J.C. Evaluation of 2-week repeated oral dose toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles in rats // Laboratory Animal Research. – 2015. – Vol. 31, N 3. – P. 139-147. – doi: 10.5625/lar.2015.31.3.139.
 15. Kumssa D.B., Joy E.J.M., Ander L., Watts M.J., Young S.D., Walker S., Broadley M.R. Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent // Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-11. – doi: 10.1038/srep10974.
 16. Lee C.M., Jeong H.J., Yun K.N., Kim D.W., Sohn M.H., Lee J.K., Jeong J., Lim S.T. Optical imaging to trace near infrared fluorescent zinc oxide nanoparticles following oral exposure // International Journal of Nanomedicine. – 2012 – Vol. 7. – P. 3203-3209. – doi: 10.2147/IJN.S32828.
 17. Mansouri E., Khorsandi L., Orazizadeh M., Jozi Z. Dose-dependent hepatotoxicity effects of zinc oxide nanoparticles // Journal of nanomedicine. – 2015. – Vol. 2, N 4. – P. 273-282.
 18. Salgueiro M.J., Bioch, Zubillaga B., Sarabia M.I., Caro R.A., De Paoli T., Hager A., Ettlin E., Weill R., Boccio J.R. Bioavailability, biodistribution, and toxicity of BioZn-AAS: a new zinc source. Comparative studies in rats // Nutrition. – 2000. – Vol. 16, N 9. – P. 762-766.
 19. Seung W.S., Song I.H., Soong H.U. Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity // Nanomaterials. – 2015. – Vol. 5, N 3. – P. 1351-1365. – doi:10.3390/nano5031351
 20. Simundic M., Drasler B., Sustar V., Zupanc J., Štukelj R., Makovec D., Erdogmus D., Hägerstrand H., Drobne D., Kralj-Iglič V. Effect of engineered TiO₂ and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles // BMC Veterinary Research. – 2013. – Vol. 9. – P. 1-7. – doi: 10.1186/1746-6148-9-7.
 21. Song W., Zhang J., Guo J. Zhang J., Ding F., Li L., Sun Z. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles // Toxicology Letters. – 2010. – Vol. 199, N 3. – P. 389-397. – doi: 10.1016/j.toxlet.2010.10.003.