

Ж.Б. Сабиров^{1,2*}, М.А. Мукашева², А.Б. Ешмагамбетова²

¹Институт общественного здравоохранения профессионального здоровья НАО «МУК», Караганда, Казахстан;

²Карагандинский университет им. академика Е.А. Букетова, Казахстан
(*E-mail: audacious_zap@mail.ru)

Изучение роли цинка в образовании хромосомных aberrаций с помощью расчетного метода оценивания

Структурные изменения хромосом, проявляющиеся вследствие химического мутагенеза, как показывают исследования, зачастую вызваны высокими концентрациями тяжелых металлов в воздухе и пыли промышленных городов. Целью статьи явилось изучение роли цинка в образовании хромосомных aberrаций. Исследована частота встречаемости хромосомных aberrаций и хромосомных аномалий у лиц, проживающих в условиях повышенной химической нагрузки. Также изучен уровень хромосомных aberrаций у лиц, проживающих на территории экологического бедствия. Выделены типы и характер цитогенетических нарушений. Проведен расчет индивидуальных дозовых нагрузок поступления химических веществ в организм из объектов окружающей среды. Методом моделирования представлена роль цинка в формировании хромосомных aberrаций. Выявлена достоверно значимая обратная корреляционная связь между уровнем хромосомных aberrаций и содержанием цинка в атмосферном воздухе (коэффициент парной корреляции Пирсона составил $-0,39$). Установлено, что при снижении концентрации цинка в атмосферном воздухе статистически значимо повышается уровень хромосомных aberrаций. Дана характеристика ко-ферментной активности цинка в функционировании ферментов системы репарации и антиоксидантной защиты. Выявлено, что хромосомные aberrации являются рефлекторами при условиях экспозиции экологических факторов экзогенного и эндогенного происхождения, вследствие чего происходят изменения в функционировании всей клетки.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, цинк, дозовая нагрузка, загрязнение окружающей среды, мутагенез.

Введение

Проблема загрязнения окружающей среды является одной из наиболее обсуждаемых и волнующих на сегодняшний день во всем мире. Антропогенное воздействие на среду обитания приводит к уже случившимся последствиям, таким как увеличение частоты заболевания всех групп нозологий, превышение предельно допустимых концентраций веществ в атмосферном воздухе, в почве и в водоемах. Загрязнение окружающей среды может быть как и прямым при промышленных выбросах и добычи полезных ископаемых, так и косвенным в результате орошения почв, нерациональном использовании водных ресурсов на примере Аральского моря, выбросов автотранспорта. В результате такого воздействия в различных экологических средах накапливаются различные токсиканты, которые негативно сказываются на состоянии здоровья населения и способны оказывать генотоксический эффект. Хромосомные aberrации (ХА) являются значимым индикатором при оценке воздействия различных факторов среды на организм, поступающих ингаляционным и оральным путем.

Содержание химических веществ в атмосферном воздухе и их поступление ингаляционным путем при дыхании можно оценить с помощью расчетного метода, что дает возможность оценить теку-

щую химическую нагрузку на организм, а также риск последствий, в зависимости от времени экспозиции и концентрации веществ.

Доза — есть измерение, определяющее количество поступления химического вещества в организм. Система «химическое воздействие — ответная реакция организма» характеризует физиологические изменения в организме на различных уровнях организации живого в ответ на количество поступления вещества и его продолжительность. Дозовую нагрузку определяют в зависимости от способа поступления химического ксенобиотика (ингаляционный, пероральный, кожный) из дифференцированных объектов экологической среды.

Расчет дозовой нагрузки включает анализ основных физических параметров, идентификацию маршрутов воздействия и оценку величины, частоты и продолжительности воздействий с расчетом поступления. Расчеты дозовых нагрузок для жителей анализируемых населенных пунктов проведены для взрослого населения. При увеличении концентрации вещества в окружающей среде повышается вероятность их проникновения в организм человека, что в результате ответной реакции организма приводит к физиологическим изменениям и оказывает общий токсический, а также генотоксический эффект. Хромосомные aberrации могут быть рефлексорами при токсикологическом воздействии экологических факторов, определяя не только ядерные и клеточные изменения, а также состояния органов и систем [1–3]. Роль отдельных микроэлементов в поддержании генетической стабильности клетки изучена в разной степени. Касательно микроэлемента цинка известно, что цинк является структурной частью множества металлосодержащих ферментов матричных процессов. Цинк определяет способность нормального функционирования этих ферментов, тем самым предотвращая риск возникновения мутаций, но при этом, однако, роль цинка в формировании хромосомных aberrаций изучена недостаточно [1, 4–6].

С учетом изложенного выше, изучение механизмов ответной реакции организма на неблагоприятное воздействие окружающей среды является актуальным и насущным вопросом для биомедицинских дисциплин.

Цель — оценить роль цинка в образовании хромосомных aberrаций с помощью расчетного метода оценивания.

Материалы и методы исследования

В выборке представлены 40 человек репродуктивного возраста (18–45), проживающие не менее 10 лет в зоне экологического бедствия Приаралья, признанным законодательно, а именно в г. Арысь (Туркестанская область) [7].

Проведен расчет индивидуальных дозовых нагрузок. Расчет ингаляционной дозовой нагрузки при оценке попадания химического ксенобиотика при дыхании из атмосферного воздуха в организм экспонируемого населения осуществлялся по рекомендациям, приведенным в Р 2.1.10.1920–04 «Руководстве по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду» от 2004 г., разработанном Ю.А. Рахманиным с соавторами [8].

Измерения концентраций неорганических веществ в атмосферном воздухе проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрометра МГА-915 (Россия), согласно М 02–09–2005 «Методике выполнения измерений массовой концентрации металлов в атмосферном воздухе атомно-абсорбционным методом с электротермической атомизацией с использованием атомно-абсорбционного спектрометра МГА-915».

Формула для расчета индивидуальных дозовых нагрузок химическими загрязнителями, поступающими ингаляционным путем, представлена на рисунке 1.

Среднее значение концентрации дозовой нагрузки составило $2,83 \pm 0,19$ мг/(кг/день) (нижний и верхний 95 %-ные доверительные интервалы 2,44 и 3,23 соответственно, СКО было равно 1,09, размах расчетных значений выборки был равен 4,31).

При определении генотоксических эффектов были приготовлены препараты хромосом с использованием нами модифицированного цитогенетического метода культивирования лимфоцитов периферической крови Hungerford D.A. et al. и последующий учет хромосомных перестроек в метафазных пластинках [9, 10]. Для учёта хромосомных aberrаций использовали микроскоп Nikon Eclipse E400 (Япония).

$$I = [(C_a \times T_{out} \times V_{out}) + (C_h \times T_{in} \times V_{in})] \times EF \times ED / (BW \times AT \times 365),$$

где I — величина поступления, мг/(кг/день);
 C_a — концентрация вещества в атмосферном воздухе, мг/м³;
 C_h — концентрация вещества в воздухе жилища, мг/м³;
 T_{out} — время, проводимое вне помещений, ч/день (8 ч/день);
 T_{in} — время, проводимое внутри помещений, ч/день (16 ч/день);
 V_{out} — скорость дыхания вне помещений, м³/ч;
 V_{in} — скорость дыхания внутри помещения, м³/ч;
 EF — частота воздействия, дней/год (350 дней/год);
 ED — продолжительность воздействия, год;
 BW — масса тела, кг;
 AT — период осреднения экспозиции, лет.

Рисунок 1. Формула расчета дозовых нагрузок, поступающих ингаляционным путем

Всего в ходе работы было зарегистрировано и просмотрено 7252 метафаз у 40 пациентов, проживающих в зоне экологического предкризиса (г. Арысь). Выборка группы обследованных была однородна: все представители были одного возраста, уровня образования, социального статуса, имели схожие бытовые условия проживания и профессии, проживали в данной местности не менее 10 лет, не имели контакта с вредными производственными факторами среды.

Материалы исследований были обработаны математико-статистическими методами с использованием программ статистической обработки данных Statistica 10.0. Применялись методы оценки достоверности различия по t-критерию Стьюдента. В качестве критерия статистической надежности выбрано значение для двух несвязанных групп ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Все хромосомные aberrации были классифицированы и определены как aberrации хроматидного типа и хромосомного типа. Абсолютное значение выявленных хромосомных aberrаций на 7252 метафазы составило 101 регистрацию, а уровень частоты хромосомных aberrаций был равен $1,392 \pm 0,137$ %, что, согласно методическим рекомендациям «Использование цитогенетического метода учёта хромосомных aberrаций для исследования мутагенности в условиях неблагоприятной экологической обстановки», можно отнести к повышенному генетическому риску [10].

Уровень частоты хромосомных aberrаций хроматидного типа был равен $1,047 \pm 0,119$ %, а частота aberrаций хромосомного типа равнялась $0,344 \pm 0,068$ % для обследуемого населения, составившего выборку исследования. Результаты исследования и анализ полученных данных показали, что по типам хромосомных aberrаций преобладали aberrации хроматидного типа (75 %), тогда как aberrации хромосомного типа составили 25 %. Таким образом, частота aberrаций хроматидного типа в 3 раза превышала частоту aberrаций хромосомного типа (см. табл.).

Т а б л и ц а

Типы хромосомных aberrаций у экспонированного населения Приаралья
($M \pm m$ %; 95 % доверительный интервал, среднее квадратичное отклонение)

Показатели	$M \pm m$	95 % ДИ	СКО	P
ХА хроматидного типа	$1,047 \pm 0,119$	1,045–1,050	0,014	0,001
ХА хромосомного типа	$0,344 \pm 0,06$	0,343–0,346	0,068	

Анализ литературных данных свидетельствует, что хромосомные aberrации хроматидного типа определены воздействием химических мутагенов и процессами химического патогенеза хромосомных нарушений [1–2, 11].

Химическую причинность мутагенеза также подтвердила выявленная в ходе исследования статистически значимая обратная причинно-следственная связь между уровнем хромосомных aberrаций у лиц, проживающих в зоне предкризиса, и дозой нагрузки цинка, поступающего ингаляционным путем (рис. 2). Коэффициент парной корреляции Пирсона составил 0,39. Установлено, что при снижении концентрации цинка в атмосферном воздухе статистически значимо повышается уровень хромосомных aberrаций: $y = 4,5747 - 0,7306 \cdot X$ (коэффициент регрессии $R = -0,39$; коэффициент детерминации $R^2 = 0,15$; коэффициент Фишера $f = 5,43$; оценка модели $p = 0,026$).

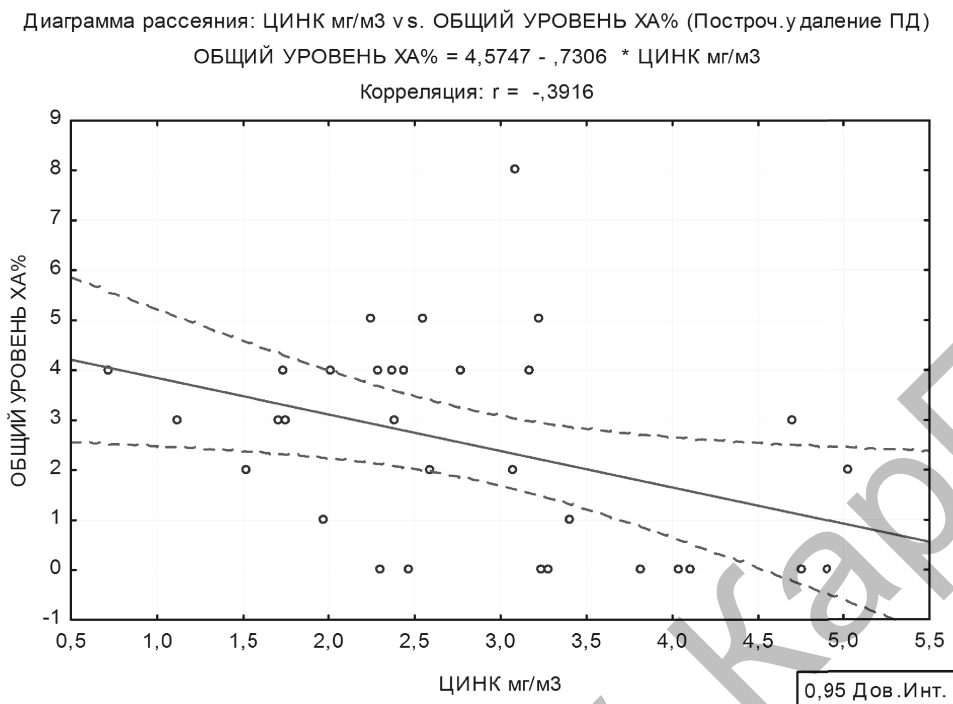


Рисунок 2. Взаимосвязь уровня ХА и концентрации цинка в атмосферном воздухе

Так, при увеличении концентрации цинка в атмосферном воздухе на 10 % можно прогнозировать повышение уровня хромосомных aberrаций на 8,3 %. Ряд авторов указали, что микроэлемент цинк входит в структуру активного центра ряда ферментов, некоторые из цинксодержащих ферментов участвуют в синтезе РНК и ДНК и имеют большое значение в метаболизме нуклеиновых кислот (ДНК- и РНК-полимеразы, тимидинкиназы, белки факторов транскрипции — цинк-фингер белки) [4–6]. Таким образом, значение цинка в генетической стабильности не вызывало сомнения, но тем не менее не было данных о его роли в формировании хромосомных aberrаций. Кроме того, цинк в качестве ко-фермента ответствен за нормальное функционирование фермента антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы и служит одним из активаторов биосинтеза металлотионеинов — специальных белков, выполняющих защитную функцию, активность которых может приводить к повреждению молекул ДНК [1]. Имеются данные, что дефицит цинка может оказывать влияние на развитие генетических заболеваний, например, синдром Danbolt-Closs (энтеропатический акродерматит — генетическое заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования) [12]. Помимо прочего, общеизвестна способность цинка уменьшать количество повреждений генетического материала, ядерных структур и клетки в целом [13, 14].

Заключение

Цитогенетические обследования и статистический анализ результатов показали, что у лиц, проживающих на территории Приаралья, факторы среды, к которым относятся тяжелые металлы (Zn), могут оказывать неблагоприятное действие на здоровье. Проявились они в виде цитогенетических нарушений, а именно наблюдалось повышение уровня хромосомных aberrаций хроматидного типа ($1,047 \pm 0,119$), кроме того, была выявлена регрессионная модель, показывающая изменения уровня хромосомных aberrаций в зависимости от концентрации Zn. По всей видимости, при недостаточной концентрации цинка происходит снижение функциональной активности ферментов матричных процессов, что, в свою очередь, приводит к возрастанию вероятности увеличения частоты хромосомных aberrаций.

Список литературы

- 1 Сабиров Ж.Б. Пути возникновения структурных мутаций при химической природе мутагенеза / Ж.Б. Сабиров // Гигиена труда и медицинская экология. — 2015. — № 2(47). — С. 26–31.

- 2 Sabirov Z.B. Evaluation of the cytogenetic status of the population living in the area before the environmental crisis / Z.B. Sabirov // Гигиена труда и медицинская экология. — 2016. — No. 4(53). — С. 70–78.
- 3 Namazbaeva Z.I. The Assessment of Halogenating Stress in Population by the Environmental and Health Monitoring / Z.I. Namazbaeva, G.N. Dosybaeva, Z.B. Sabirov, L.T. Bazelyuk, G.K. Asanov, I.O. Baidalet // International Journal of Environmental and Science Education. — 2016. — Vol. 11, No. 10. — P. 3884–3893.
- 4 Harada T. Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes / T. Harada, I. Koyama, T. Matsunaga, A. Kikuno, T. Kasahara, M. Hassimoto et al. // The FEBS journal. — 2005. — Vol. 272, No. 10. — P. 2477–2486.
- 5 Story S.V. Characterization of novel zinc-containing, lysine-specific aminopeptidase from the hypertermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* / S.V. Story, C. Shah, F.E. Ir. Jenney, M.W. Adams // J. Bacteriol. — 2005. — Vol. 187, No. 6. — P. 2077–2083.
- 6 Gielen M. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents. The Use of Metals in Medicine / M. Gielen, E.R.T. Tiekink. — Weinheim: Wiley & Sons, 2005. — 598 p.
- 7 Закон Республики Казахстан от 30 июня 1992 г. № 1468-ХІІ. «О социальной защите граждан, пострадавших вследствие последствий экологического бедствия в Приаралье». [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://adilet.zan.kz/rus/docs/Z920002600>.
- 8 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду: Р 2.1.10.1920–04–2004. [Введен в действие от 2004–03–05]. — М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 290 с.
- 9 Hungerford D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D.A. Hungerford // Stain Technology. — 1965. — Vol. 40, No. 6. — P. 333–338.
- 10 Сабиров Ж.Б. Использование цитогенетического метода учёта хромосомных aberrаций для исследования мутагенности в условиях неблагоприятной экологической обстановки: метод. реком. / Ж.Б. Сабиров, З.И. Намазбаева, Л.К. Ибраева, Н.М. Жанбасинова. — Караганда: Нац. центр гигиены труда и проф. заболеваний, 2016. — 34 с.
- 11 Намазбаева З.И. Оценка цитогенетического статуса лиц, проживающих на территории промышленного города / З.И. Намазбаева, Ж.Б. Сабиров, А.М. Айткулов, К.Б. Бекишев, Г.К. Турлыбекова // Вестн. Караганд. ун-та. Сер. Биология. Медицина. География. — 2014. — № 3(75). — С. 100–103.
- 12 Хлебникова А.Н. Цинк: его биологическая роль и применение в дерматологии / А.Н. Хлебникова, Д.Д. Петрунин // Вестн. дерматологии и венерологии. — 2013. — № 6. — С. 100–116.
- 13 Record I.R. Protection by zinc against UVA and UVB-induced cellular and genomic damage in vivo and in vitro / I.R. Record, M. Jannes, I.E. Dreosti // Biol Trace Elem Res. — 1996. — No. 53. — P. 19–25.
- 14 Richard M.J. Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts toward oxidant stress / M.J. Richard, P. Guiraud, M.T. Leccia, J.C. Beani, A Favier // Biological trace element research. — 1993. — Vol. 37, No. 2–3. — P. 187.

Ж.Б. Сабиров, М.А. Мукашева, А.Б. Ешмагамбетова

Есептік бағалау әдісінің көмегімен хромосомды aberrациялардың қалыптасуындағы мырыштың рөлін зерттеу

Өнеркәсіптік қалалардағы шаң құрамын талдау оларда көбінесе хромосомдық aberrация ретінде көрінетін мутагендік қасиеттерді көрсете алатын ауыр металдардың едәуір концентрациясының болуын көрсетеді. Мақаланың мақсаты хромосомалық мутацияның пайда болуындағы мырыштың рөлін зерттеу. Жоғары химиялық жүктеме жағдайында тұратын адамдарда хромосомдық aberrациялар мен хромосомдық аномалиялардың кездесу жиілігі зерттелді. Сондай-ақ экологиялық апат аумағында тұратын адамдардың хромосомдық aberrациялар деңгейі тексерілген. Цитогенетикалық бұзылулардың түрлері мен сипаты көрсетілген. Химиялық заттардың қоршаған орта объектілерінен ағзаға түсуінің жеке дозалық жүктемелерінің есебі жүргізілді. Модельдеу әдісімен хромосомды aberrацияларды қалыптастыруда мырыштың рөлі көрсетілген. Хромосомдық aberrациялар деңгейі мен атмосфералық ауадағы мырыш құрамы арасындағы сенімді кері корреляциялық байланыс анықталды (Пирсонның бу корреляция коэффициенті $-0,39$ құрады). Атмосфералық ауадағы мырыш концентрациясының төмендеуі кезінде хромосомдық aberrациялар деңгейі статистикалық тұрғыдан жоғарылайтыны анықталды. Репарация және антиоксиданттық қорғаныс жүйесі кезінде ферменттерінің қызмет етуінде мырыштың ко-ферменттік белсенділігінің сипаттамасы берілген. Хромосомалық aberrация экофакторлардың әртүрлі экзогенді және эндогенді әсеріне сезімталдығы бар, бұл жасушалардың функционалдық өзгерістеріне әсер етеді.

Кілт сөздер: хромосомдық aberrациялар, мырыш, дозалық жүктеме, қоршаған ортаның ластануы, мутагенез.

Z.B. Sabirov, M.A. Mukasheva, A.B. Eshmagambetova

Study of the role of zinc in the formation of chromosomal aberrations using the calculated estimation method

The composition of dust in industrial cities indicates the presence of these large concentrations of heavy metals indicates their ability to exert mutagenic, often manifested as chromosomal aberrations. The aim of the article was to study the role of zinc in the formation of chromosomal aberrations. The article shows the frequency of occurrence of chromosomal aberrations in a population, that lives in conditions of increased chemical pollution. The level of chromosomal aberrations in individuals living in the territory of an ecological disaster was studied. The types and nature of cytogenetic disorders are highlighted. The calculation of the individual dose loads of the intake of chemicals into the body from the environment. The simulation method presents the role of zinc in the formation of chromosomal aberrations. A significant inverse correlation was found between the frequency of chromosomal abnormalities and the zinc content in atmospheric air (the Pearson pair correlation coefficient was -0.39). It has been proven that with a decrease in the concentration of zinc in atmospheric air, the level of chromosomal aberrations increases statistically significantly. We described the co-enzymatic activity of zinc in the enzymes of the repair system and antioxidant defense. It was noted that chromosomal aberrations are sensitive to various exogenous and endogenous effects of environmental factors, which affect the functional changes of these cells. As a result, specific disturbances are determined.

Keywords: chromosomal aberrations, zinc; dose loading, environmental pollution, mutagenesis.

References

- 1 Sabirov, Z.B. (2015). Puti voznikoveniia strukturnykh mutatsii pri khimicheskoi prirode mutaheneza [The pathways of structural mutations in the chemical nature of mutagenesis]. *Higiiena truda i meditsinskaia ekolohiia — Occupational health and medical ecology*, 2, 26–31 [in Russian].
- 2 Sabirov, Z.B. (2016). Evaluation of the cytogenetic status of the population living in the area before the environmental crisis. *Higiiena truda i meditsinskaia ekolohiia — Occupational health and medical ecology*, 4, 70–78.
- 3 Namazbaeva, Z.I., Dosybaeva, G.N., Sabirov, Z.B., Bazelyuk, L.T., Asanov, G.K., & Baidaulet, I.O. (2016). The Assessment of Halogenating Stress in Population by the Environmental and Health Monitoring. *International Journal of Environmental and Science Education*, 11, 10, 3884–3893.
- 4 Harada, T., Koyama, I., Matsunaga, T., Kikuno, A., Kasahara, T., & Hassimoto M. (2005). Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes. *The FEBS journal*, 272(10), 2477–2486.
- 5 Storz, S.V., Shah, C., Jenney, F.E.Ir., & Adams, M.W. (2005). Characterization of novel zinc-containing, lysine-specific aminopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.*, 187, 6, 2077–2083.
- 6 Gielen, M., & Tiekink, E.R. (2005). *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. Weinheim: Wiley & Sons.
- 7 Zakon Respubliki Kazakhstan ot 30 iunia 1992 h. № 1468-XII. «O sotsialnoi zashchite hrazhdan, postradavshikh vsledstvie posledstviia ekolohicheskogo bedstviia v Priarale» [Law of the Republic of Kazakhstan of June 30, 1992 «On social protection of citizens affected by the consequences of an environmental disaster in the Aral Sea region»]. *adilet.zan.kz*. Retrieved from <http://adilet.zan.kz/rus/docs/Z920002600/> [in Russian].
- 8 Rukovodstvo po otsenke riska dlia zdoroviia naseleniia pri vozdeistvii khimicheskikh veshchestv, zahriazniushchikh okruzhaiushchuiu sredy [Guidance on assessing public health risk from exposure to chemicals that pollute the environment]. (2004). *R 2.1.10.1920–04–2004 from 5th March 2004*. Moscow: Federalnyi tsentr Hossanepidnadzora Minzdrava Rossii [in Russian].
- 9 Hungerford, D.A. (1965). Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain technology*, 40(6), 333–338.
- 10 Sabirov, Zh.B., Namazbaeva, Z.I., Ibrayeva, L.K., & Zhanbasinova, N.M. (2016). *Ispolzovanie tsitoheneticheskogo metoda ucheta khromosomnykh aberratsii dlia issledovaniia mutahennosti v usloviakh neblahopriatnoi ekolohicheskoi obstanovki [The use of the cytogenetic method of accounting for chromosomal aberrations for the study of mutagenicity in adverse environmental conditions: guidelines]*. Karaganda: Natsionalnyi tsentr hiiyeny truda i professionalnykh zabolevanii [in Russian].
- 11 Namazbaeva, Z.I., Sabirov, Zh.B., Aytkulov, A.M., Bekishev, K.B., & Turlybekova, G.K. (2014). Otsenka tsitoheneticheskogo statusa lits, prozhivaiushchikh na territorii promyshlennogo horoda [Assessment of the cytogenetic status of persons residing in an industrial city]. *Vestnik Karahandinskogo universiteta. Seriya Biolohiia. Meditsina. Heohrafiia — Bulletin of the Karaganda University. Series Biology. Medicine. Geography*, 3, 100–103 [in Russian].
- 12 Khlebnikova, A.N., & Petrunin, D.D. (2013). Tsink, ego biolohicheskaiia rol i primeneniie v dermatolohii [Zinc, its biological role and application in dermatology]. *Vestnik dermatolohii i venerolohii — Bulletin of Dermatology and Venereology*, 6, 100–116 [in Russian].
- 13 Record, I.R., Jannes, M., & Dreosti, I.E. (1996). Protection by zinc against UVA and UVB-induced cellular and genomic damage in vivo and in vitro. *Biological trace element research*, 53, 19–25.
- 14 Richard, M.J., Guiraud, P., Leccia, M.T., Beani, J.C., & Favier, A. (1993). Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts toward oxidant stress. *Biological trace element research*, 37(2–3), 187.