

МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У КРЫС ЛИНИИ Wistar ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ХРОМА*

С.В. ЛЕБЕДЕВ^{1, 2}, И.А. ГАВРИШ^{1, 2}, И.З. ГУБАЙДУЛЛИНА¹

Высокоэнергетические рационы, многокомпонентные кормовые смеси и добавки в составе современных рационов требуют особого внимания при оптимизации лимитируемых микроэлементов. Хром используется для коррекции углеводного, жирового и липидного обмена. Ввиду низкого содержания хрома в компонентах рациона роль этого элемента в формировании микроэкологического статуса организма малоизучена. От источника хрома зависит его биологическая доступность в организме. В представленной работе на модельном объекте (крысы линии Wistar) мы впервые сравнили биологическое действие различных форм хрома (пиколинат, наноформы и хлорид) в дозах 300 и 500 мкг/кг корма по комплексу показателей (усвояемость, гематологические показатели крови, активность пищеварительных ферментов, состав кишечной микрофлоры), установив высокую биодоступность и более выраженный положительный эффект пиколината и наночастиц (НЧ) хрома в отношении массы тела и гематологических показателей и неоднозначное влияние изученных форм на активность пищеварительных ферментов и микрофлору кишечника. Целью настоящей работы было исследование биологического действия хрома в различной форме и дозировке на крыс линии Wistar. Исследования проводили на 105 белых крысах-самцах массой 70-80 г в стандартных условиях вивария (ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН). Животных разделили на семь групп (по $n = 15$). Контрольная группа содержалась на общем рационе. В рацион I группы включали НЧ Cr_2O_3 в дозе 300 мкг/кг корма (НЧ 300), II — CrCl_3 в дозе 300 мг/кг (CrCl_3 300), III — пиколинат хрома (CrPic) в дозе 300 мг/кг (CrPic 300), IV — НЧ Cr_2O_3 в дозе 500 мкг/кг корма (НЧ 500), V — CrCl_3 в дозе 500 мг/кг (CrCl_3 500), VI — CrPic в дозе 500 мг/кг (CrPic 500). Наночастицы вводили в комбикорм посредством ступенчатого смешивания. Введение CrPic и НЧ в дозе 500 мкг/кг на фоне одинакового расхода корма приводило к увеличению массы крыс на 22,6 и 22,2 % ($p \leq 0,05$). При воздействии НЧ Cr_2O_3 реакция лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов отсутствовала, в остальных случаях их количество превышало контрольные значения на 14-45 %. В вариантах НЧ 300, CrCl_3 300 и CrCl_3 500 синтез гемоглобина был адекватен стимуляции эритропоэза, но увеличение количества тромбоцитов приводило к сладжированию крови, повышению вязкости и затруднению перфузии через сосуды. Высокая усвояемость CrPic и НЧ 500 (от 20,2 до 34,0 %) сопровождалась проявлением гепато- и нефротоксичности с признаками окислительного стресса, снижением активности амилазы и липазы в плазме крови, что свидетельствует о депрессирующем влиянии высоких доз хрома на энтеропанкреатическую циркуляцию пищеварительных ферментов и нарушении обмена Mg и Fe в крови. Количество триглицеридов снижалось при максимальных дозах хрома в форме хлорида и пиколината, что подтверждает их участие в липидном обмене. Отсутствие токсичности при низких дозах (НЧ 300 и CrPic 300) наглядно демонстрировали показатели билирубина и креатинина. Активность амилазы в поджелудочной железе увеличивалась при НЧ 300. Включение CrPic в аналогичной дозировке стимулировало активность липазы и протеазы. CrCl_3 и CrPic в дозировке 500 мкг/кг снижали активность липазы в 12-перстной кишке. Специфическое действие НЧ 500 на микроэкологический статус организма проявилось в снижении численности лактобактерий на 55,9 %. Количество бифидобактерий было выше на 48,6 % ($p \leq 0,05$) в группе PicCr 500. Численность энтеробактерий в группе НЧ 300 оказалась ниже контроля на 34,8 %, в то время как в остальных группах она увеличилась в 24,0-33,7 раза ($p \leq 0,05$). Таким образом, хром (CrPic 500, НЧ 300) не проявляет выраженного токсического эффекта на организм и оказывает стимулирующее действие на рост, развитие, активность пищеварительных энзимов и микроэкологический статус организма, что ставит эти формы в разряд перспективных источников хрома для коррекции обмена веществ и микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных.

Ключевые слова: крысы, концентрация хрома, продуктивность, биохимические показатели крови, пищеварительные ферменты, кишечная микрофлора.

Хром (Cr) считается необходимым элементом для животных и человека, но понимание механизма его биологического действия остается не

* Работа выполняется при финансовой поддержке подпрограммы «Изучение механизмов адаптации системы пищеварения млекопитающих животных и птицы к рационам с различным ингредиентным составом кормов» (Постановление Президиума РАН № 132 от 05.07.2017) в рамках государственного задания № 0761-2018-0031).

до конца изученным. Известно, что хром усиливает функцию инсулина, а также стимулирует скорость индуцированного инсулином набухания изолированных митохондрий (1), увеличивает респираторный фактор эпидимальной жировой ткани (2), взаимодействует со щитовидной железой (3), играет важную роль в метаболизме белков, нуклеиновых кислот за счет значительного увеличения стимуляции включения аминокислот в белок печени *in vitro* (4). S. Okada с соавт. (5) установили, что непосредственное взаимодействие Cr с ДНК ведет к значительной стимуляции синтеза РНК *in vitro*, а также определили уникальный белок, содержащий 5-6 атомов Cr, которому свойственны анаболические функции. Обнаружено новое Cr-связывающее вещество (6), которое потенцирует эффект инсулина при превращении глюкозы в липид и углекислый газ в изолированных адипоцитах (6).

Хотя хром существует в природе в состояниях окисления от Cr²⁺ до Cr⁶⁺, относительно инертные комплексы Cr³⁺ могут функционировать как структурные компоненты, которые связывают лиганды с надлежащей пространственной ориентацией, способствуя ферментативному катализу, а также поддерживают третичные структуры белков или нуклеиновых кислот (7). У кур включение дополнительного хрома в рацион улучшало показатели физиологического состояния и продуктивности при холодом и теплом стрессе (8, 9), а у свиней добавление 200 мкг пиколината хрома (CrPic) в рацион увеличивало скорость абсорбции азота (10).

В современном животноводстве наблюдается тенденция к замене традиционных минеральных источников микроэлементов на новые органико-минеральные или наноформы, что обусловлено их лучшей усвояемостью, биодоступностью и пролонгированным действием (11, 12). Показано, что метаболический ответ организма на хром зависит от его химической формы: органические источники имеют более высокую биодоступность (10-25 %), чем неорганические (3 %) (13). Уменьшение размера частиц хрома может увеличить скорость переваривания и абсорбции. T.F. Lien с соавт. (14) установили, что наночастицы CrPic значительно лучше усваивались по сравнению с обычным CrPic, что приводило к повышению содержания хрома в сыворотке крови у крыс. При включении наночастиц хрома в рацион свиней увеличивалась площадь длиннейшей мышцы и содержание хрома в тканях, уменьшалось жировое соотношение и толщина спинного жира (15, 16). В исследованиях на крысах наноразмерный хром значительно увеличил средний прирост массы тела, эффективность использования корма, соотношение жировых отложений, концентрацию инсулина в сыворотке крови и содержание хрома в органах (17).

Можно предположить, что изменение конверсии корма, мясной продуктивности и биохимических показателей у животных основано на механизмах участия хрома в пищеварении и обмене веществ через стимуляцию активности пищеварительных энзимов. Исследование альтернативных форм микроэлементов в рационе животных — необходимый инструмент для управления процессами пищеварения, формирования продуктивности и пищевой ценности животноводческой продукции.

В представленной работе на модельном объекте (крысы линии Wistar) мы впервые сравнили биологическое действие различных форм хрома (пиколинат, наноформы и хлорид) в дозах 300 и 500 мкг/кг корма по комплексу показателей (усвояемость, гематологические показатели крови, активность пищеварительных ферментов, состав кишечной микрофлоры), установив высокую биодоступность и более выраженное положительное влияние пиколината и наночастиц хрома на массу тела и гематологические показатели, а также неоднозначный эффект изученных форм в отношении

активности пищеварительных ферментов и микрофлоры кишечника.

Целью настоящей работы было изучение биологического действия хрома в различной форме и дозировке на крыс линии Wistar.

Методика. Исследования проводили на 105 белых крысах-самцах линии Wistar массой 70-80 г в стандартных условиях вивария (ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН). Рацион животных (ГОСТ Р 50258-92) соответствовал правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ Р 51000.3-96 и Р 51000.4-96). Экспериментальную часть работы выполняли в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики и «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)». Крысы содержались в отдельных клетках со свободным доступом к воде и корму.

На основании результатов испытаний, проведенных ранее (16, 17), дозы хрома в наших экспериментах составили 300 и 500 мкг/кг корма. После подготовительного периода (7 сут) животных разделили на семь групп (по $n = 15$). Контрольная группа содержалась на общем рационе. В рацион I группы включали НЧ Cr_2O_3 в дозе 300 мкг/кг корма (НЧ 300), II — CrCl_3 в дозе 300 мг/кг (CrCl_3 300), III — пиколинат хрома в дозе 300 мг/кг (CrPic 300), IV — НЧ Cr_2O_3 в дозе 500 мкг/кг корма (НЧ 500), V — CrCl_3 в дозе 500 мг/кг (CrCl_3 500), VI — CrPic в дозе 500 мг/кг (CrPic 500). Наночастицы вводили в комбикорм при ступенчатом смешивании.

Ультрадисперсные частицы (УДЧ) хрома получали методом плазмохимического синтеза (ООО «Платина», г. Москва; $d = 91$ нм, удельная поверхность $9 \text{ м}^2/\text{г}$, Z-потенциал $93 \pm 0,52$ мВ, содержание Cr 99,8 %). Препараты наночастиц диспергировали в физиологическом растворе с помощью УЗДН-2Т («НПП Академприбор», Россия; 35 кГц, 300 Вт, 10 мкА, 30 мин). Использовали также неорганическую форму Cr в форме хлорида хрома $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а (19,5 % Cr) (АО «Рехим», Россия) и пиколинат хрома (содержит 10 % органического хрома; ЗАО «Эвалар», Россия).

В начале и конце эксперимента (21-е сут) учитывали ростовые показатели и расход корма. Кровь отбирали из хвостовой вены в вакуумные пробирки с добавлением антикоагулянта, для биохимических показателей — в вакуумные пробирки с активатором свертывания (тромбин). Морфологический анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе URIT-2900 Vet Plus («URIT Medical Electronic Group Co., Ltd», Китай), биохимический анализ сыворотки крови — на автоматическом анализаторе CS-T240 («DIRUI Industrial Co., Ltd», Китай) с коммерческими наборами для ветеринарии (ЗАО «ДИАКОН-ДС», Россия).

После декапитации крыс на 21-е сут под нембуталовым наркозом (5 особей из каждой группы) отбирали биосубстраты для анализа. Концентрацию хрома определяли в начале и конце эксперимента в измельченных образцах биоматериала (все ткани и системы организма), корма и фекалий с последующим озолением в микроволновой системе разложения Multiwave 3000 («Anton Paar», Австрия). Элементный состав исследовали методами атомно-эмиссионной спектроскопии (Optima 2000 V, «Perkin Elmer», США) и масс-спектрометрии (Elan 9000, «Perkin Elmer», США).

Перевариваемость хрома оценивали на основании общего сбора биосубстратов (кал, моча) в период проведения балансового опыта (5 сут) в индивидуальных метаболических клетках (<http://цгт-ягпу.пф/dxl-d>). Усвояемость Cr (У, %) рассчитывали по формуле: $У = \{[(\text{индивидуальное потребление корма} \times \% \text{ Cr}) - (\text{количество фекалий и мочи за период 5 сут в граммах} \times \% \text{ Cr})] \times (\text{индивидуальное потребление корма для крыс} \times \% \text{ Cr})\}^{-1}$

Cr)} × 100.

Для оценки состояния ферментативной системы животным после убоя рассекали брюшную стенку, извлекали 12-перстную кишку и поджелудочную железу. Для подготовки проб тканей исследуемых органов навески (1 г) растирали в охлажденном растворе Рингера (4 мл), гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин (СМ-12, «Фабрика НВ-групп», Россия). Амилазную активность определяли по методу Н. Coles (18), липазную — по J.H. Boutwell (19), протеазную — с использованием методики Ц.Ж. Батоева (20). Активность исследованных ферментов выражали в условных единицах (усл. ед., разность показаний пробы с субстратом и холостой пробы в расчете на 1 г влажной навески ткани слизистой кишечника за 1 мин).

Образцы содержимого кишечника собирали в стерильные пробирки Эппендорф. Для комплексного изучения микрофлоры по 0,1 мл каждого из 10-кратных разведений высевали на питательные среды по стандартной методике (21). Использовали Эндо-агар, мясо-пептонный агар (МПА), желточно-солевой агар (ЖСА) (ООО «НИЦФ», Россия), Rogosa agar, Bifidobacterium Agar, BSA («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd», Индия). Окончательный результат количественного содержания бактерий в грамме фекалий выражали как КОЕ/г.

Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Статистическая обработка полученных результатов включала расчет среднего значения (M) и стандартных ошибок среднего ($\pm SEM$). Достоверность различий сравниваемых показателей определяли по t -критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с использованием ANOVA (программный пакет Statistica 10.0, «StatSoftInc.», США) и Microsoft Excel.

Результаты. На фоне практически одинакового расхода корма за период эксперимента (830 ± 17 г/гол.) добавление в рацион 500 мкг/кг CrPic и НЧ 500 сопровождалось увеличением массы крыс на 22,6 и 22,2 % ($p \leq 0,05$) и снижением соотношения количества брюшного жира к массе тела. Масса печени и почек существенно не отличалась от контрольных значений. Аналогично в исследованиях T.F. Lien с соавт. (14) дополнительное включение в рацион Cr (0,2 мг) увеличивало среднесуточный прирост массы без повышения расхода корма и нивелировало отложения жира. О сходном влиянии органических и наночастиц хрома по сравнению с его минеральной формой сообщалось ранее (13).

Был установлен положительный баланс в накоплении хрома при использовании в рационе CrPic в дозах 300 и 500 мкг/кг, что сравнимо с результатами исследований M.Q. Wang с соавт. (15). Биодоступность НЧ Cr достигала наибольшего положительного баланса при дозе 500 мкг/кг и была выше контроля на 81,6 %. В остальных группах усвояемость хрома находилась в диапазоне 4,3-7,5 % и была наименьшей при использовании CrCl₃ (табл. 1).

Ранее в исследованиях M.Q. Wang с соавт. (15) была описана способность наночастиц хрома стимулировать ростовые показатели, увеличивая при этом отложение металла в мышцах, сердце, печени и почках. Это происходит за счет лучшего поглощения наночастиц Cr в кишечнике и высокой проникающей способности частиц Cr через кровеносные капилляры (23). Всосавшийся хром связывается в основном с трансферрином, распределяется по тканям в зависимости от химического состояния, в котором элемент поступил в организм (24), выводится с мочой и фекалиями в форме ацетатных и цитратных комплексов в течение 4 сут в количестве

1. Морфометрические показатели и усвояемость различных форм хрома у крыс линии Wistar ($M \pm SEM$, опыт в условиях вивария)

Показатель	Группа						
	контрольная	I	II	III	IV	V	VI
Начальная масса тела, г	69,30±2,95	114,20±2,80	75,50±2,88	87,90±1,19	101,80±7,63	81,10±3,13	100,30±5,50
Живая масса в конце опыта, г	118,60±3,50	149,30±0,10	131,20±9,86	146,70±7,01	152,30±6,30*	123,30±4,17	151,50±6,50*
Масса печени, г	5,55±0,49	5,03±0,43	6,88±0,43	7,90±0,45*	6,50±0,32	6,23±0,67	6,70±0,45
Масса почек, г	1,20±0,08	1,13±0,06	1,15±0,16	1,43±0,27	1,23±0,19	1,43±0,23	1,53±0,22*
Внутренний жир, г/отношение к массе тела	1,33±0,21	1,21±0,10	1,80±0,37*	1,63±0,21	1,25±0,09	1,37±0,79	2,10±0,30*
Прирост, г	49,30±1,10	35,10±0,90*	55,70±1,20	58,80±2,30*	50,50±1,35	42,20±0,95	51,20±1,32
Содержание в рационе Сг, мг/кг	0,13	0,43	0,43	0,43	0,63	0,63	0,63
Содержание Сг в кале, мг/кг	0,97±0,01	3,18±0,12***	3,27±0,18***	2,75±0,05***	3,30±0,13***	4,83±0,24***	4,02±0,74***
Содержание Сг в теле, мг/кг	0,18±0,05	0,05±0,00*	0,05±0,00*	0,06±0,00	0,21±0,04	0,06±0,00*	0,09±0,00*
Усвояемость Сг, %	6,7±0,3	7,6±0,4*	4,9±0,6*	20,2±1,1**	34,5±1,3*	4,3±0,9*	20,2±1,6

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

*, ** и *** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$.

2. Морфологические показатели крови у крыс линии Wistar на 21-е сут после введения в рацион хрома в различных формах и дозировках ($M \pm SEM$, опыт в условиях вивария)

Показатель	Группа						
	контрольная	I	II	III	IV	V	VI
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	7,50±3,50	11,00±1,60*	10,70±1,10	12,20±2,60*	7,10±1,70	8,80±2,10	9,00±2,10
Лимфоциты, $\times 10^9$ /л	3,80±1,80	6,50±2,10*	5,80±0,70*	5,10±1,40*	3,80±1,10	4,60±0,90*	5,20±1,20*
Моноциты, $\times 10^9$ /л	1,60±0,80	2,10±0,80	1,70±0,10	2,30±0,90	1,60±0,80	1,70±0,01	1,70±0,30
Гранулоциты, $\times 10^9$ /л	2,10±0,78	2,40±0,90	3,00±0,30	4,80±1,10*	1,70±1,07	2,50±0,08	2,40±0,20
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	4,69±0,63	5,79±1,10	5,70±0,70	5,64±1,80	5,67±1,70	5,21±0,80	5,36±1,10
Гемоглобин, г/л	103,00±15,60	128,00±22,10*	125,00±3,60*	125,00±23,10*	119,00±12,50	115,00±12,60	119,00±23,60
Гематокрит, %	26,40±7,80	31,40±11,20	30,70±11,50	32,00±9,90*	28,00±9,68	28,10±3,60	29,10±2,40
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	120,00±25,30	233,00±35,20*	237,00±23,60*	169,00±25,30	110,00±15,60	204,00±9,80*	186,00±12,50

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

3. Биохимические показатели сыворотки крови у крыс линии Wistar на 21-е сут после введения в рацион хрома в различных формах и дозировках ($M \pm SEM$, опыт в условиях вивария)

Показатель	Группа						
	контрольная	I	II	III	IV	V	VI
Глюкоза, ммоль/л	3,11±1,40	1,99±0,90	2,44±1,10	3,78±1,80	7,00±2,10*	7,74±2,10*	2,32±1,60
Общий белок, г/л	63,60±9,80	68,30±10,30	57,90±16,30	63,30±9,70	64,90±11,60	62,50±12,10	61,60±9,90
Билирубин общий, мкмоль/л	8,90±0,40	8,30±2,10	6,80±1,10*	7,10±0,90	11,60±1,50	10,90±2,10	9,60±1,90
Холестерин, ммоль/л	1,85±1,90	1,59±0,68	1,48±0,78	2,27±0,68	1,85±1,30	1,80±0,80	1,45±0,35
Триглицериды, ммоль/л	9,63±1,80	10,80±3,60	8,61±2,80	7,69±2,10	6,84±2,10	5,88±1,20*	5,69±1,60*
Мочевина, ммоль/л	7,20±1,10	7,60±2,40	5,90±2,10	5,30±1,90	4,00±1,40*	6,40±1,30	6,10±1,80
Креатинин, мкмоль/л	29,70±8,90	27,60±11,30	33,90±9,60	30,80±11,10	19,70±4,30	33,90±2,10	36,10±3,10
Кальций, ммоль/л	1,80±0,40	2,00±0,11	1,88±0,01	2,27±0,20	1,98±0,60	1,94±0,27	2,10±0,21
Железо, мкмоль/л	41,00±7,60	41,10±11,4	27,30±8,70*	29,70±7,70*	49,50±8,10	35,80±4,10	32,40±5,60
Амилаза, Ед/л	1266,00±42,30	1112,90±45,30	1130,60±39,60	1578,00±23,60	1414,00±19,60	643,80±122,30*	648,00±214,30*
Липаза, Ед/л	2,40±0,70	4,80±2,40	0,80±1,10**	2,10±1,10	3,10±0,90	1,10±0,01*	1,60±0,03*
Магний, ммоль/л	0,90±0,04	0,68±0,04	0,78±0,01	0,45±0,01	1,17±0,07	0,63±0,01	0,52±0,02
Фосфор, ммоль/л	3,65±0,80	3,82±1,40	3,59±1,40	4,04±2,10	1,87±1,30**	5,18±1,20*	3,86±1,60

П р и м е ч а н и е. Описание групп см. в разделе «Методика».

* и ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

4. Активность (Ед/мл) пищеварительных ферментов в поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке у крыс линии Wistar на 21-е сут после введения в рацион хрома в различных формах и дозировках ($M \pm SEM$, опыт в условиях вивария)

Группа	Двенадцатиперстная кишка			Поджелудочная железа		
	амилаза	протеаза	липаза	амилаза	протеаза	липаза
Контрольная	81,8±6,7	2,0±0,4	0,9±0,2	31,5±0,5	2,0±0,2	4,1±0,4
I	90,7±13,2	4,6±1,2	0,3±0,1	88,8±4,7*	1,9±0,1	4,4±0,7
II	58,4±10,8	3,6±0,2	2,3±0,6	32,8±10,2	2,6±0,1	4,3±0,2
III	37,4±5,1*	3,1±0,2	2,7±0,2*	5,8±2,3*	4,1±0,4*	13,7±0,5*
IV	80,7±9,8	2,5±0,3	1,3±0,3	32,3±1,1	2,5±0,4	5,9±0,7
V	72,8±13,3	2,2±0,2	2,8±0,4*	54,4±7,8	2,6±0,4	3,7±0,6
VI	85,7±7,5	2,9±0,7	4,1±0,5*	55,4±9,4	1,7±0,1	5,2±0,3

П р и м е ч а н и е. Описание групп см. в разделе «Методика».

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

60-90 % от поступившего хрома (25).

Чтобы избежать искажения в интерпретации данных при оценке действия различных форм хрома на организм, особенно в концентрации, превышающей биотическую, необходимо использовать маркеры. Они должны исключать скрытые токсические эффекты, которые связаны с нарушением обмена веществ и выражаются в накоплении жира, изменении гематологических и биохимических параметров крови (27) (табл. 2).

В нашем эксперименте особенностью действия дозы НЧ 500 было отсутствие реакции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, в то время как при дозе НЧ 300 эти показатели превышали контрольные значения на 14-45 % ($p \leq 0,05$). Обнаруженные эффекты хрома в отношении группы форменных элементов сходны с таковыми при внесении НЧ меди и железа (28). Добавление хрома в рацион крыс стимулировало эритропоэз, наибольший эффект достигался при концентрации CrPic 300: показатель гематокрита у животных в III группе был на 17,5 % ($p \leq 0,05$) больше, чем в контроле. Синтез гемоглобина соответствовал стимуляции эритропоэза, но увеличение количества тромбоцитов приводило к сладжированию крови, повышению вязкости и затруднению перфузии через сосуды. Эта симптоматика была характерна для НЧ 300, CrCl_3 300 и CrCl_3 500 (разница с контролем от 70 до 90 %, $p \leq 0,05$). Причиной такого эффекта могла быть тромбогенность наночастиц, а в случае с CrCl_3 — проявление токсических свойств этого соединения.

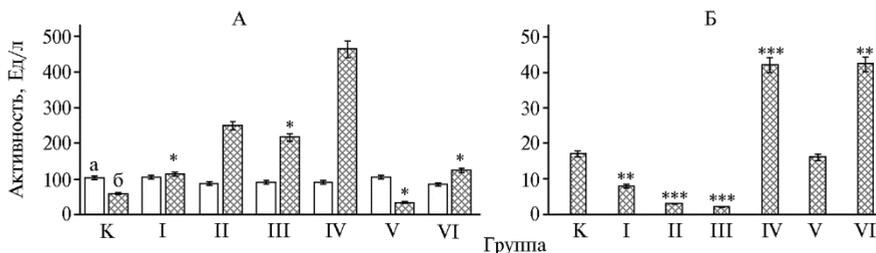
Два аспекта биосовместимости наноматериалов — тромбогенность и гемолитическая активность требуют особого внимания, поскольку после проникновения через барьерные структуры организма наночастицы оказываются в лимфе и кровотоке, что предполагает их контакт как с макромолекулами плазмы крови и лимфы, так и с форменными элементами. Известно, что частицы с отрицательным зарядом поверхности могут запустить образование тромба посредством контактной активации каскада свертывания крови, приводящей к образованию фибрина, то есть они активируют внешний путь свертывания крови.

Мы установили гипер- и гипогликемический эффект влияния хрома в различных формах и дозировках на организм крыс (табл. 3). Поскольку 65-70 % циркулирующей в крови глюкозы утилизируется центральной нервной системой, это предопределяет опасность гипогликемических состояний, существенно изменяющих метаболизм мозга, что в конечном итоге приводит к гибели нейронов и нарушению его функции (29). Так, в IV и V опытных группах было отмечено достоверное увеличение содержания глюкозы в 2,49 и 2,25 раза ($p \leq 0,05$). Концентрация общего белка между группами достоверно не различалась. Максимальное снижение содержания креатинина наблюдали в крови у крыс из IV группы (на 33,7 %), что, наряду со снижением содержанием мочевины на 44,4 % ($p \leq 0,05$), было одним из критериев нарушений в работе выделительного аппарата (17).

Количество триглицеридов как истинных жиров снижалось при максимальных дозах хрома в форме хлорида и пиколината, что свидетельствует о влиянии хрома на липидный обмен, о расщеплении избыточного жира в организме и снижении коэффициента соотношения количества жира к массе с 2,00 (контроль) до 0,82 (НЧ 500). Влияние хрома на липидный обмен также опосредуется его регулирующим действием на функционирование инсулина.

Активность панкреатических ферментов амилазы и липазы в плазме крови снижалась с увеличением содержания CrCl_3 и CrPic в корме,

что указывает на депрессирующее воздействие используемых форм хрома на энтеропанкреатическую циркуляцию пищеварительных ферментов. При внесении НЧ 500 снижалось содержание фосфора на 48,8 % ($p \leq 0,05$). Интересны данные, касающиеся содержания в сыворотке крови железа. Если при низкой концентрации хром и железо преимущественно занимают различные сайты связывания (30, 31), то при более высоком содержании они конкурируют за них, что проявилось в снижении метаболизма железа в опытных группах, получавших рацион с хлоридом и пиколилатом хрома. Анализ реакции аминотрансфераз (рис.) как индикатора наличия повреждений в клетках установил снижение активности АсАТ на 42,7 % при дозе НЧ 500 ($p \leq 0,01$) и увеличение при НЧ 300, CrPic 300, CrPic 500 в 1,97 ($p \leq 0,001$); 3,75 ($p \leq 0,001$); 2,14 раза ($p \leq 0,01$) в сравнении с контролем на фоне стабильно высокого содержания билирубина. Это объясняется массивным выходом ферментов в кровяное русло при разрушении клеток, вызванном началом окислительного стресса и различными патологическими процессами. Достоверное снижение активности АлАТ на 10,7 % ($p \leq 0,05$) при воздействии НЧ 500 может быть косвенным признаком нарушения клубочковой фильтрации, что подтверждается снижением содержания креатинина на 33,7 % ($p \leq 0,05$) относительно контроля (рис., А).



Активность аминотрансфераз (А) и γ -глутамилтрансферазы (Б) в сыворотке крови у крыс линии Wistar на 21-е сут после введения в рацион ультрадисперсных частиц хрома в разных формах и дозировках: а — аланинаминотрансфераза, б — аспаратаминотрансфераза; К — контроль, I — НЧ Cr₂O₃ (300 мкг/кг корма), II — CrCl₃ (300 мг/кг), III — CrPic (300 мг/кг), IV — НЧ Cr₂O₃ (500 мкг/кг), V — CrCl₃ (500 мг/кг), VI — CrPic (500 мг/кг) ($M \pm SEM$, $n = 15$, опыт в условиях вивария).

*, ** и *** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$.

Анализ активности γ -глутамилтрансферазы (γ -ГТ) в сыворотке крови выявил достоверное увеличение при введении в рацион НЧ 500 и CrPic 500, что могло быть обусловлено гибелью клеток, застоем внутри протоков или токсическим воздействием на фоне интоксикации (32). Введение НЧ Cr₂O₃, CrCl₃ и CrPic в дозе 300 мг/кг приводило к снижению этого показателя. НЧ Cr₂O₃ в дозе 500 мг/кг оказали наибольшее влияние на гематологические показатели. Неоднозначное проявление активности ферментов переаминирования, с одной стороны, может свидетельствовать о разрушении мембран клеток, с другой — о слабой индукции микросомального окисления под влиянием НЧ переменной валентности (33). Остальные формы хрома в использованных дозировках не привели к критическим изменениям в системе гемостаза.

Способность хрома быстро проникать в отделы кишечника (через 1 ч после кормления) и образовывать в нем стабильные трудно абсорбируемые гидраты предполагает его участие в выработке пищеварительных ферментов (34). В нашем исследовании наблюдалось стимулирование активности амилазы в поджелудочной железе при внесении НЧ 300 и уменьшении этого показателя в варианте с использованием CrPic 300. При этом CrPic

оказывал стимулирующее воздействие на активность липазы и протеазы. В 12-перстной кишке снижение активности амилазы на 54,3 % ($p \leq 0,05$) и увеличение активности липазы на 67,7 % ($p \leq 0,05$) было характерно для CrPic 300. Добавление в рацион крыс НЧ CrCl3 и CrPic в дозировке 500 мкг/кг стимулировало активность липазы (табл. 4).

Несмотря на отсутствие в мировой научной литературе данных, объясняющих механизм действия НЧ хрома на пищеварительные ферменты, перспективной представляется возможность модулировать их активность за счет индукции. Адсорбция биологических макромолекул на поверхности наночастицы может изменять их пространственную структуру и, соответственно, некоторые функциональные свойства. Так, фермент α -химотрипсин, адсорбированный на однослойных углеродных нанотрубках, теряет 99 % активности из-за нарушения вторичной структуры (35). При адсорбции белков на наночастицах большего размера, благодаря образованию дополнительных контактов, наблюдаются выраженные изменения структуры и функции белков (36).

Учитывая разнополярность действия хрома на активность пищеварительных ферментов, необходимо подчеркнуть, что наночастицы и пиколинат обладают сходным действием за счет возможного непосредственного контакта с активным центром фермента (37).

5. Численность микроорганизмов ($\times 10^6$ КОЕ/г) в толстом кишечнике у крыс линии Wistar на 21-е сут после введения в рацион хрома в различных формах и дозировках ($M \pm SEM$, опыт в условиях вивария)

Микроорганизмы	Группы						
	контрольная	I	II	III	IV	V	VI
Лактобактерии	14,3 \pm 2,1	9,3 \pm 1	10 \pm 1,1	12,6 \pm 2,1	6,3 \pm 0,8*	8,0 \pm 1,1	8,6 \pm 0,4
Бифидобактерии	14,9 \pm 4,1	11,7 \pm 0,9	12,3 \pm 1,5	13,1 \pm 0,9	6,5 \pm 0,4	22,0 \pm 2,2	29,0 \pm 2,5*
Энтеробактерии	0,8 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1*	25,0 \pm 2,3**	29,0 \pm 3,1**	23,0 \pm 3,7**	20,6 \pm 2,4*	26,0 \pm 2,9**

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

* и ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

Численность лактобактерий в IV группе была на 55,9 % ($p \leq 0,05$) ниже, чем в контроле, в остальных — достоверно не изменялась. Количество бифидобактерий в VI группе оказалось на 48,6 % выше контрольного ($p \leq 0,01$). Численность энтеробактерий в группе НЧ 300 была ниже, чем в контроле, на 34,8 % ($p \leq 0,05$), в то время как в остальных группах их количество увеличилось в 24,0–33,7 раза (табл. 5).

Таким образом, хром в форме наночастиц и пиколината в дозе до 300 мкг/кг может быть использован в качестве бактериостатического агента для коррекции содержания бифидобактерий в кишечнике. Содержание билирубина и креатинина, увеличение активности амилазы в поджелудочной железе, липазы и протеазы в 12-перстной кишке наглядно продемонстрировали отсутствие токсичности НЧ 300 и CrPic 300 для крыс линии Wistar. Применение хрома в дозе 500 мкг/кг, независимо от формы элемента, сопровождалось проявлением гепато- и нефротоксичности с признаками окислительного стресса. Высокая усвояемость CrPic и НЧ 500 (от 20,2 до 34,0 %) оказывала депрессирующее воздействие на энергетический обмен и энтеропанкреатическую циркуляцию пищеварительных ферментов, снижалось содержание триглицеридов и коэффициент соотношения между количеством жира и массы тела. Депрессия липидного обмена подтверждалась снижением активности амилазы в 12-перстной кишке. В целом перспективность использования наноразмерных подкормок обусловлена преобладанием поверхностных взаимодействий. Благодаря своим размерам, сопоставимым с размерами клеток, вирусов, белков, ДНК, наноча-

стицы могут приближаться к биообъекту и связываться с ним, вовлекаясь в биохимические процессы в организме.

*¹ФГБНУ ФНЦ биологических систем
и агротехнологий РАН,*

460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,

e-mail: lsv74@list.ru ✉ gavrish.irina.ogu@gmail.com. gubaidullinae@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет,

460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13

*Поступила в редакцию
7 ноября 2018 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 2, pp. 304-315

DIFFERENT CHROME SOURCES INFLUENCE ON MORPHO- BIOCHEMICAL INDICATORS AND ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES IN Wistar RATS

S.V. Lebedev^{1, 2}, I.A. Gavrish^{1, 2}, I.Z. Gubaydullina¹

¹Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, 29, ul. 9 Yanvarya, Orenburg, 460000 Russia, e-mail lsv74@list.ru (✉ corresponding author), gavrish.irina.ogu@gmail.com, gubaidullinae@mail.ru;

²Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia

ORCID:

Lebedev S.V. orcid.org/0000-0001-9485-7010

Gubaydullina I.Z. orcid.org/0000-0001-7862-3660

Gavrish I.A. orcid.org/0000-0002-9377-7673

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the subprogram "Study of the mechanisms of adaptation of the digestive system of mammals and poultry to diets with different ingredient composition of feed" (Decree of the Presidium of the Russian Academy of Sciences No. 132 of 05.07.2017) within the framework of the state task 0761-2018-0031

Received November 7, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2019.2.304eng

Abstract

Nowadays, issues of mineral nutrition of humans and animals are quite relevant. High-energy rations, multicomponent feed mixtures and additives in the diets require special attention when optimizing limited microelements. A priori, chromium, being an important trace element in animals, is used to correct carbohydrate, fat and lipid metabolism. Due to its low content in the components of diets, its role in the formation of the microecological status of the body is poorly understood. At the same time, its biological availability in the body depends on the source of chromium. In the present work, using a model object, the Wistar rats, we for the first time compared the biological effects of various chromium sources, i.e. picolinate (CrPic), nanoform (NP Cr₂O₃) and chloride (CrCl₃) at doses of 300 and 500 µg/kg feed, according to a set of indicators (feed digestibility, hematological parameters, activity of digestive enzymes, composition of intestinal microflora) and established greater bioavailability and more pronounced positive effect of picolinate and chromium nanoparticles on body weight and hematological parameters and ambiguous influence of the studied forms on the activity of digestive enzymes and intestinal microflora. The purpose of this work was to study the biological effect of chromium in various forms and dosages on Wistar rats. The studies were carried out on 105 white male rats weighing 70-80 g under standard vivarium conditions (Federal Scientific Center for Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences). Animals were divided into seven groups (*n* = 15 each). The control group was fed a common diet. The group I diet included Cr₂O₃ NPs at a dose of 300 µg/kg feed (NP 300), group II — CrCl₃ at a dose of 300 mg/kg (CrCl₃ 300), group III — chromium picolinate (CrPic) at a dose of 300 mg/kg (CrPic 300), group IV — Cr₂O₃ NPs at a dose of 500 µg/kg of feed (NP 500), group V — CrCl₃ at a dose of 500 mg/kg (CrCl₃ 500), and group VI — CrPic at a dose of 500 mg/kg (CrPic 500). Nanoparticles were introduced into the feed by mixing. The introduction of chromium in the form of CrPic and Cr₂O₃ NPs at a dose of 500 µg/kg, under the same feed consumption, was accompanied by an increase in the body weight of rats by 22.6 and 22.2 % (*p* ≤ 0.05). The effect of Cr₂O₃ NPs expressed as the absence of the reaction of lymphocytes, monocytes and granulocytes, in other cases their level exceeded control values by 14 to 45 %. Synthesis of hemoglobin was adequate to stimulation of erythropoiesis, but an increase in the number of platelets resulted in blood sludging, an increase in viscosity and difficulty in perfusion through vessels. This symptom was typical for NP Cr₂O₃ 300, CrCl₃ 300 and CrCl₃ 500 (the difference with the control is from 70 to 90 %, *p* ≤ 0.05). High digestibility of CrPic and NPs Cr₂O₃ 500 (from 20.2 to 34.0 %), accompanied by manifestation of hepato- and nephrotoxicity, with signs of oxidative stress, decreased activity of amylase and lipase in the blood plasma, indicating a depressant effect of high doses of chromium on enteropancreatic circulation of the digestive enzymes and metabolic disorders of Mg and Fe in the blood. Triglycerides, like true fats, decreased at maximum doses of chromium in the form of chloride and picolinate,

confirming their participation in lipid metabolism, causing splitting of excess fat in the body, and reducing the ratio of fat to body weight ratio from 2 (control group) to 0.82 (NP Cr₂O₃ 500). The indicators of bilirubin and creatinine clearly demonstrate the absence of toxicity at low doses, i.e. Cr₂O₃ NPs 300 and CrPic 300. Amylase activity in the pancreas is increased at a dose of 300 µg/kg of Cr₂O₃ NPs. Dietary CrPic in a similar dosage stimulated the activity of lipase and protease, whereas in the 12 duodenal ulcer it led to a decrease in the activity of amylase and lipase. CrCl₃ and CrPic at a dosage of 500 µg/kg reduced the activity of lipase in the duodenum. The specific effect of Cr NPs 500 µg/kg on the microecological status of the organism was manifested in a decrease in the number of lactic acid bacteria by 55.9 %. The number of bifidobacteria was significantly higher, by 48.6 % ($p \leq 0.05$), in the PicCr 500-fed group. The number of enterobacteria in the NP 300-fed group was 34.8 % lower than the control, while in the other groups their number increased 24.0-33.7 times ($p \leq 0.05$). From the totality of the estimated parameters of the intestinal microflora, the use of nanoparticles in the composition of the diet is promising due to the lack of resistance. Thus, chromium of CrPic 500, NP Cr₂O₃ 300 does not show a toxic effect on the body, and has a stimulating effect on growth, development, digestibility of chromium, the activity of the digestive enzymes and microecological status of the organism, which puts these forms in the category of promising sources of chromium for the correction of metabolism and the microbial composition of the gastro-intestinal tract of animals.

Keywords: rats, chromium concentration, productivity, blood biochemical parameters, digestive enzymes, intestinal microflora.

REFERENCES

1. Campbell W.J., Mertz W. Interaction of insulin and chromium (III) on mitochondrial swelling. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1963, 204(6): 1028-1030 (doi: 10.1152/ajplegacy.1963.204.6.1028).
2. Mertz W., Roginski E.E. Chromium metabolism: the glucose tolerance factors. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1971, 33: 163-239.
3. Hasan H.G., Mahmood T.J., Ismael P.A. Studies on the relationship between chromium (III) ion and thyroid peroxidase activity in sera of patients with thyroid dysfunction. *Ibn AL-Haitham Journal for Pure and Applied Science*, 2017, 24(2): 1-10.
4. Shukla A., Shukla J.P. Hexavalent chromium induced alterations in the nucleic acids and protein metabolism in the liver of the fingerlings of freshwater siluroid, *Mystus (M.) vittatus* (Bl.) *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2016, 10: 20 (doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(6).2667-70).
5. Okada S., Tsukada H., Tezuka M. Effect of chromium (III) on nucleolar RNA synthesis. *Biological Trace Element Research*, 1989, 21(1): 35-39 (doi: 10.1007/BF02917234).
6. Vincent J.B. Chromium: basic nutritional and toxicological aspects. In: *Molecular, genetic, and nutritional aspects of major and trace minerals*. J. Collins (ed.). Academic Press, 2016.
7. Vincent J. *The nutritional biochemistry of chromium (III)*. Elsevier, 2018.
8. Sahin K., Sahin N., Onderci M., Gursu F., Cikim G. Optimal dietary concentration of chromium for alleviating the effect of heat stress on growth, carcass qualities, and some serum metabolites of broiler chickens. *Biological Trace Element Research*, 2002, 89(1): 53-64 (doi: 10.1385/BTER:89:1:53).
9. Onderci M., Sahin N., Sahin K., Kilic N. Antioxidant properties of chromium and zinc. *Biological Trace Element Research*, 2003, 92(2): 139-149 (doi: 10.1385/BTER:92:2:139).
10. Kornegay E.T., Wang Z., Wood C.M., Lindemann M.D. Supplemental chromium picolinate influences nitrogen balance, dry matter digestibility, and carcass traits in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 1997, 75(5): 1319-1323 (doi: 10.2527/1997.7551319x).
11. Florence A.T. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(3): 259-266 (doi: 10.1023/A:1012029517394).
12. Desai C., Jain K., Madamwar D. Evaluation of in vitro Cr (VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr (VI) polluted industrial landfill. *Biore-source technology*, 2008, 99(14): 6059-6069 (doi: 10.1016/j.biortech.2007.12.046).
13. National Research Council (NRC) *Mineral tolerance of animals. Second revised edition, Committee on minerals and toxic substances in diets and water for animals, Board on agriculture and natural resources, Division on earth and life studies*. National Academy Press, Washington D.C., 2005.
14. Lien T.F., Yeh H.S., Lu F.Y., Fu C.M. Nanoparticles of chromium picolinate enhance chromium digestibility and absorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(7): 1164-1167 (doi: 10.1002/jsfa.3569).
15. Wang M.Q., Xu Z.R. Effect of chromium nanoparticle on growth performance, carcass characteristics, pork quality and tissue chromium in finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2004, 17(8): 1118-1122 (doi: 10.5713/ajas.2004.1118).
16. Wang M.Q., Xu Z.R., Zha L.Y., Lindemann M.D. Effects of chromium nanocomposite supplementation on blood metabolites, endocrine parameters and immune traits in finishing pigs. *Animal*

- Feed Science and Technology*, 2007, 139(1-2): 69-80 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.12.004).
17. Zha L.Y., Wang M.Q., Xu Z.R., Gu L.Y. Efficacy of chromium(III) supplementation on growth, body composition, serum parameters, and tissue chromium in rats. *Biological Trace Element Research*, 2007, 119(1): 42-50 (doi: 10.1007/s12011-007-0042-8).
 18. Coles E.H. *Veterinary clinical pathology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
 19. Boutwell J.H. Clinical chemistry. Laboratory manual and methods. *Journal of Medical Education*, 1962, 37(2): 158.
 20. Batoev Ts.Zh. V sbornike: *Trudy Buryatskogo SKHI* [In: Proceedings of the Buryat Agricultural Institute]. Ulan-Ude, 1971, vyp. 25: 122-126 (in Russ.).
 21. Gazumarova L.D., Titov L.P., Klyuiko N.L. *Bakteriologicheskaya diagnostika disbakterioza kishchechnika: instruktsiya po primeneniyu* [Bacteriological diagnosis of intestinal dysbiosis: instructions]. Leningrad-Minsk, 2010 (in Russ.).
 22. Oberlis D., Kharland B., Skal'nyi A. *Biologicheskaya rol' makro- i mikroelementov u cheloveka i zhivotnykh* [Biological role of macro- and microelements in humans and animals]. St. Petersburg, 2008 (in Russ.).
 23. Hussain N., Jaitley V., Florence A.T. Recent advances in the understanding of uptake of micro-particulates across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 1(50): 107-142 (doi: 10.1016/S0169-409X(01)00152-1).
 24. Sizova E., Yausheva E., Miroshnikov S., Lebedev S., Duskaev G. Element status in rats at intramuscular injection of iron nanoparticles. *OSPC — Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 2015, 12(2): 119-127.
 25. Underwood E.J. Chromium. In: *Trace elements in human and animal nutrition* /E.J. Underwood (ed.). Academic Press, New York, 1997.
 26. Oberleas D., Kwun I.S. Confirmation of the mechanism of zinc homeostasis. In: *Metal ions in biology and medicine-international symposium*, vol. 5. P. Collery, P. Bratter, V. Negretti de Bratter, L. Khassanova, J.C. Etienne (eds.). John Libbey Eurotext, Paris, 1998: 140-145.
 27. Sizova E.A., Miroshnikov S.A., Kalashnikov V.V. Morphological and biochemical parameters in Wistar rats influenced by molybdenum and its oxide nanoparticles. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(6): 926-936 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.929eng).
 28. Yausheva E.V., Miroshnikov S.A., Kvan O.V. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2013, 12(161): 203-207 (in Russ.).
 29. Bagchi D., Sidney J., Downs B.W., Bagchi M., Preuss H.G. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 2002, 180(1): 5-22 (doi: 10.1016/S0300-483X(02)00378-5).
 30. Sargeant T., Lim T.H., Jenson R.L. Reduced chromium retention in patients with hemochromatosis: a possible basis of hemochromatotic diabetes. *Metabolism*, 1979, 28(1): 70-79 (doi: 10.1016/0026-0495(79)90171-9).
 31. Ani M., Moshtaghie A.A. The effect of chromium on parameters related to iron metabolism. *Biological Trace Element Research*, 1992, 32(1-3): 57-64 (doi: 10.1007/BF02784588).
 32. Shamsutdinova I.R., Derkho M.A.. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2015, 6(56): 122-124 (in Russ.).
 33. Speetjens J.K., Collins R.A., Vincent J.B., Woski S.A. The nutritional supplement chromium(III) tris(piccolinate) cleaves DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 1999, 12(6): 483-487 (doi: 10.1021/tx9900167).
 34. Mooney K.W., Cromwell G.L. Efficacy of chromium picolinate and chromium chloride as potential carcass modifiers in swine. *Journal of Animal Science*, 1997, 75(10): 2661-2671 (doi: 10.2527/1997.75102661x).
 35. Karajanagi S.S., Vertegel A.A., Kane R.S., Dordick J.S. Structure and function of enzymes adsorbed onto single-walled carbon nanotubes. *Langmuir*, 2004, 20(26): 11594-11599 (doi: 10.1021/la047994h).
 36. Vertegel A.A., Siegel R.W., Dordick J.S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 2004, 20(16): 6800-6807 (doi: 10.1021/la0497200).
 37. Win K.Y., Feng S.S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2713-2722 (doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.050).