

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ, СВЯЗАННЫЕ С ПОСТУПЛЕНИЕМ В ОРГАНИЗМ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ НАНОЧАСТИЦ ХРОМА В РАЗНОЙ ДОЗИРОВКЕ*

С.В. ЛЕБЕДЕВ^{1, 2}, И.А. ГАВРИШ^{1, 2}, И.З. ГУБАЙДУЛЛИНА¹, С.В. ШАБУНИН³

Хром — важный химический элемент для человека и животных, его эссенциальность проявляется в снижении количества глюкозы и холестерина в крови, уменьшении жировых отложений. Всасывание хрома зависит от его источника, размера частиц и состава рациона, при этом уменьшение размера частиц Cr позволяет увеличить скорость усвоения хрома в организме. Перспективность замены традиционных источников микроэлементов на органические и ультрадисперсные формы металлов определяется высокой удельной площадью поверхности последних, большей реакционной способностью и биодоступностью. В настоящей работе мы впервые показали, что наночастицы (НЧ) Cr₂O₃ в дозах от 50 до 100 мкг/кг корма не обладают токсичным действием, влияют на формирование продуктивных качеств через стимулирование выработки пищеварительных ферментов и оказывают положительное действие на абсорбцию элемента в тушке цыплят-бройлеров. Нашей целью была биологическая аттестация различных доз наночастиц хрома в рационе цыплят-бройлеров (*Gallus gallus*) по активности пищеварительных ферментов, биохимическим и микробиологическим показателям. Исследования проводили на цыплятах-бройлерах кросса Арбор Айкрос (ОАО «Птицефабрика Оренбургская», 2018 год). На основании ежесуточного взвешивания методом пар-аналогов сформировали 5 групп: одну контрольную и четыре опытных ($n = 30$, масса от 160 до 180 г). Контрольная птица на протяжении всего эксперимента получала основной рацион. Птицам опытных групп в период эксперимента (14-42-е сут) в основной рацион дополнительно вводили НЧ Cr₂O₃ ($d = 91$ нм; ООО «Платина», г. Москва, Россия) в следующих дозах: I группа — 50, II — 100, III — 200 и IV — 400 мкг/кг корма. Мы установили увеличение живой массы и улучшение конверсии корма при дозе НЧ 200-400 мкг/кг соответственно на 3,1-3,9 и 7-11 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. При этом накопление Cr в тушке бройлеров увеличилось на 28,2 и 25,6 % при дозе НЧ 200 и 400 мкг/кг на фоне снижения этого показателя в помете на 15 %. Увеличение показателя $Cr_{\text{корм}}/Cr_{\text{пoмeт}}$ (1,5-2,5) и $Cr_{\text{корм}}/Cr_{\text{тушка}}$ (4,6-6,4) в опытных группах свидетельствовало о положительной скорости абсорбции хрома в желудочно-кишечном тракте. При скармливании НЧ Cr₂O₃ отмечали повышенные показатели активности эндогенных трансфераз (аланинаминотрансферазы и асартатамино-трансферазы), активность каталазы, супероксиддисмутазы и концентрация малонового диальдегида не изменялись, то есть хром, действуя как антиоксидант, стимулировал рост концентрации NO-метаболитов в сыворотке крови (на 18 %, $p \leq 0,05$). Под влиянием НЧ Cr₂O₃ увеличивалась активность ферментов в плазме крови: амилазы на 29,5 % (IV группа, $p \leq 0,05$) на 21-е сут, липазы на 19-30 % (III и IV группы, $p \leq 0,05$) на 21-е и 42-е сут на фоне снижения липолитической активности к окончанию эксперимента в опытных группах по сравнению с 21-ми сут. Действие НЧ на пищеварительные ферменты в дуоденальном химусе проявлялось в снижении активности амилазы, стимуляции выработки липазы и протеазы при дозе 50 и 400 мкг/кг с увеличением значений pH кишечного содержимого от 4,62 до 9,34 во всех опытных группах. В помете наблюдалась обратная динамика. Включение 50 мкг/кг НЧ Cr₂O₃ в рацион сопровождалось снижением числа бифидобактерий, стафилококков и сальмонелл. Доза 100 мкг/кг способствовала росту числа энтеробактерий, а 400 мкг/кг — наоборот, его уменьшению на 20 % с одновременной депрессией численности сальмонелл в слепой кишке. У птицы в опытных группах сокращалось число бифидобактерий. Таким образом, по совокупности оцениваемых параметров использование НЧ Cr₂O₃ в рационе в дозе 50-100 мкг/кг имеет более выраженный положительный эффект и такая добавка может быть рекомендована как источник хрома для сельскохозяйственной птицы (например, в составе премикса или витаминно-минерального комплекса).

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, антиоксидантные ферменты, Cr, продуктивность, концентрация Cr, биохимические показатели крови, пищеварительные ферменты.

Хром — важный химический элемент для человека и животных, его эссенциальность, согласно нормам (1), проявляется в снижении концентрации глюкозы и холестерина в крови, уменьшении жировых отложений, стимуляции развития мышечной ткани (2). Недостаточное поступле-

* Работа финансируется Министерством науки и образования РФ для выполнения фундаментальных научных исследований, определяемым Президиумом Российской академии наук (Соглашение № 075-02-2019-1847).

ние хрома в организм, связанное с типом и качеством питания, сопровождается замедлением роста и ухудшением толерантности к глюкозе (3). Cr стимулирует функцию инсулина, усиливая функцию рецепторов чувствительных к инсулину клеток (4-6).

Важный инструмент в регуляции обмена поступившего в организм хрома — его способность проникать через кишечную стенку. Этот процесс ускоряется при уменьшении размера частиц хрома и наличии пищеварительных агентов (витамины, фитаты, аминокислоты). Хром имеет чрезвычайно низкую переваримость, плохо всасывается (для органических форм — 25 %, неорганических — 3 %), при этом всасывание Cr^{3+} происходит в основном через почки (80-95 %) (7) с потерями при депонировании в волосяном покрове, выведении через сальные железы и с желчью (45 %) (8), что свидетельствует о быстром поглощении и рекреации Cr. Независимо от увеличения дозы хрома в рационе (40-240 мкг/сут) степень его усвоения остается постоянной — 0,4-2,0 % (9). Органический Cr оказывает более благоприятное воздействие на птицу по сравнению с неорганическими формами из-за повышенной абсорбции и биодоступности (10). Следовательно, факторы, обуславливающие всасывание хрома, — это его источник, размер частиц и состав рациона, при этом уменьшение размера частиц Cr позволяет увеличить скорость усвоения хрома в организме.

Перспективность замены традиционных источников микроэлементов на органические и ультрадисперсные формы металлов определяется высокой удельной площадью поверхности последних, большей реакционной способностью и биодоступностью. Учитывая малые размеры и высокую проникающую способность наночастиц (НЧ), необходимо помнить, что каждый отдел желудочно-кишечного тракта имеет уникальную среду со специфическим набором энзимов и pH (11). Наночастицы должны быть в состоянии преодолеть эти препятствия, чтобы проявить биологическую активность в тонком отделе кишечника (11).

Биологическое действие наночастиц хрома связано с участием в метаболизме нуклеиновых кислот, увеличением площади мышц, накоплением хрома в тканях, уменьшением количества жира (12, 13). В экспериментах на птице добавление хрома в рацион увеличивало количество белка в мышцах груди и бедра и снижало содержание холестерина в мышцах (14).

Следует отметить, что отчеты о влиянии различных источников хрома на активность пищеварительных энзимов у животных встречаются редко, хотя изучение возможности использования НЧ в качестве модуляторов активности пищеварительных ферментов представляется перспективным. Известно, что в молекулах ферментов существует несколько регуляторных центров, специализированных по отношению к различным эффекторам (15). По мнению ряда исследователей, быстрые конформационные переходы могут происходить в результате действия модификаторов (16). Альтернативные формы микроэлементов могут быть необходимым инструментом в управлении процессами пищеварения для улучшения конверсии питательных веществ, повышения продуктивности и пищевой ценности птицеводческой продукции.

В настоящей работе нами впервые было показано, что НЧ Cr_2O_3 в дозах от 50 до 100 мкг/кг корма не обладают токсичным действием, влияют на формирование продуктивных качеств через стимулирование выработки пищеварительных ферментов и оказывают положительное действие на абсорбцию элемента в тушке цыплят-бройлеров.

Нашей целью была биологическая аттестация различных доз наночастиц хрома в рационе цыплят-бройлеров (*Gallus gallus*) по активности

пищеварительных ферментов, биохимическим и микробиологическим показателям.

Методика. Исследования проводили на цыплятах-бройлерах кросса Арбор Айкрес (ОАО «Птицефабрика Оренбургская», <http://www.pfo56.ru>, 2018 год). Экспериментальную часть работы выполняли в соответствии с протоколами Женевской конвенции, принципами надлежущей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009), правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.4-96) и «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals» (National Academy Press Washington, D.C., 1996). Птицу содержали в клетках КУН-05 площадью 4050 см² (90×45×45 см) и маркировали пластиковыми ножными бирками. На основании ежесуточного взвешивания методом пар-аналогов сформировали 5 групп: одну контрольную и четыре опытных ($n = 30$, масса от 160 до 180 г). Птицу кормили 2 раза в сутки рационном, приготовленным с учетом рекомендаций (17) в соответствии с потребностью в разные возрастные периоды.

Состав основного рациона (ОР) в стартовый и ростовой период был следующим: зерно пшеницы (соответственно 27,1 и 41,2 %), кукуруза (16 и 22 %), шрот соевый (25 и 15 %), шрот подсолнечный (18 и 8 %), масло подсолнечное (5 и 2,8 %), монохлоргидрат лизина, 98 % (0,35 и 0,17 %), DL-метионин (0,10 и 0,13 %), L-треонин (0,03 и 0,54 %), соль поваренная (0,28 и 0,3 %), монокальцийфосфат (0,7 и 0,7 %), мел кормовой (0,5 и 0,4 %), известняковая мука (1,0 и 0,7 %), премикс (2 %) (ООО «Коудайс МКорма», Россия). Поение осуществлялось вволю. Взвешивание проводили еженедельно. Контрольная птица на протяжении всего эксперимента получала основной рацион. Птицам опытных групп в период эксперимента (14-42-е сут) в основной рацион дополнительно вводили НЧ Cr₂O₃ ($d = 91$ нм, удельная поверхность — 9 м²/г, Z-потенциал — $93 \pm 0,52$ мВ, содержание Cr — 99,8 %, метод получения — плазмохимический синтез; ООО «Платина», г. Москва, Россия) в следующих дозах: I группа — 50, II — 100, III — 200 и IV — 400 мкг/кг. Дозировки корма были выбраны с учетом ранее полученного положительного эффекта влияния хрома на ростовые и биохимические показатели цыплят-бройлеров (18, 19). Комбикорм готовили методом ступенчатого смешивания, НЧ вводили после диспергирования в физиологическом растворе (УЗДН-2Т, «НПП Академприбор», Россия; 35 кГц, 300 Вт, 10 мкА, 30 мин).

Кровь для анализа брали перед убоем в 21- и 42-суточном возрасте утром натощак из подкрыльцовой вены. Сыворотку крови исследовали на автоматическом анализаторе CS-T240 («DIRUI Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих наборов для ветеринарии ДиаВетТест (ООО «Диакон-Вет», Россия) и Randox Laboratories Limited («Randox Laboratories, Ltd.», Великобритания).

Биоматериал получали после декапитации бройлеров под нембуталовым наркозом на 21-е и 42-е сут. Проводили послеубойную анатомическую разделку тушек, измеряли абсолютную и относительную массу внутренних органов с последующим измельчением и озолением (Multiwave 3000, «Anton Paar», Австрия). Микроэлементный анализ осуществляли методами атомно-эмиссионной спектрометрии (Optima 2000 V, «Perkin Elmer», США) и масс-спектрометрии (Elan 9000, «Perkin Elmer», США) согласно рекомендациям производителя.

Для оценки активности пищеварительных ферментов непосредственно после вскрытия извлекали кишечник, отбирали в стерильные пробирки поджелудочную железу и 12-перстную кишку. Активность панкреа-

тических ферментов измеряли на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих биохимических наборов для ветеринарии ДиаВетТест (ООО «Диакон-Вет», Россия), активность протеазы — методом гидролиза казеина (20).

Качественный и количественный состав микробиоценоза кишечника бройлеров определяли по стандартной методике (21). В работе использовали Эндо-агар («ООО НИЦФ», Россия) для энтеробактерий с нормальной ферментативной активностью и условно-патогенных лактозонегативных энтеробактерий, мясо-пептонный агар (МПА) (ООО «НИЦФ», Россия) — для аэробной флоры, Рогоза-агар («Himedia», Индия) — для лактобактерий, Бифидо-агар («Himedia», Индия) — для молочнокислых бактерий (бифидобактерий), желточно-солевой агар (ЖСА) (ООО «НИЦФ», Россия) — для подсчета стафилококков, ВСА-агар («Himedia», Индия) — для патогенных сальмонелл. Посевы инкубировали в течение 24-72 ч при температуре 37 °С. Число микроорганизмов каждой группы в 1 г кишечного содержимого (М) подсчитывали по формуле $M = N \times 10^n$, где N — число колоний, n — разведение материала. Окончательный результат в расчете на 1 г содержимого слепой кишки выражали как КОЕ/г.

Статистический анализ выполняли методом ANOVA (программный пакет Statistica 10.0, «StatSoft, Inc.», США) и в программе Microsoft Excel. Статистическую достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Достоверными считали значения при $p \leq 0,05$. Данные представлены как средние значения (*M*) и стандартные ошибки средних (\pm SEM).

Результаты. За период эксперимента расход корма на 1 кг прироста живой массы в контроле составил 1,85 кг, в зависимости от дозы НЧ Cr₂O₃ разница с контролем составляла от 8 до 16 %. Наибольшими ростовыми показателями характеризовалась птица в III и IV опытных группах (табл. 1). Аналогичный ростостимулирующий эффект был получен другими авторами при испытании в качестве добавки НЧ Fe, Cu, Zn (22, 23). Имеются данные об отрицательном действии препарата хрома в дозе 400 г/т на продуктивность и сохранность бройлеров (24), тогда как дозы до 1200 мкг/кг положительно влияют на живую массу и эффективность потребления корма (18, 19, 25).

1. Показатели роста и содержание хрома в биосубстратах и тушке цыплят-бройлеров кросса Арбор Айкрес в зависимости от дозы наночастиц Cr₂O₃ в рационе (*M*±SEM, *n* = 30, опыт в условиях вивария, 42-е сут эксперимента)

Показатель	Группа				
	контроль	I	II	III	IV
Начальная масса, г	224±2,4	230±4,3	234±3,0	224±3,2	232±23,1
Конечная масса, г	2266±20,3	2366±40,1	2431±36,4	2533±59,8	2536±78,2
Расход корма, г:					
всего	3774,30	3649,80	3739,53	3855,70	3853,97
на 1 кг прироста	1,85	1,71	1,70	1,67	1,55
Содержание Cr, мкг/кг:					
в рационе	540±1,5	587±1,5	637±2,5*	736±2,7*	937±2,4**
в помете	433±3,5	373±4,6	466±6,1	363±4,2	366±3,8
в тушке	108±0,2	125±2,4**	129±4,1**	132±3,2*	145±2,8**
Соотношение Cr:					
корм/помет	1,2	1,5	1,3	2,0	2,5
корм/тушка	5,0	4,6	4,9	5,5	6,4

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

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

Известно, что биологическая роль минеральных веществ в организме зависит от их биохимической доступности. В нашем эксперименте при максимальных дозах введения 200 и 400 мкг/кг содержание Cr в туш-

ке бройлеров было на 28,2 и 25,6 % выше, чем в контроле, на фоне снижения его доли в помете на 15 %. Коэффициент $C_{г\text{корм}}/C_{г\text{помет}}$ был наибольшим в группах с высоким содержанием хрома в рационе, что свидетельствует об его лучшем использовании. В то же время степень усвоения из корма, выраженная коэффициентом $C_{г\text{корм}}/C_{г\text{тушка}}$, находилась в диапазоне 4,6-6,4, что указывает на отсутствие агломераций (образования более крупных по размерам вторичных частиц), характерных для наночастиц, поступающих в организм в высоких дозах, а также о наличии регуляторного механизма в метаболизме хрома (23). Учитывая, что в клетках тканей кишечника эффективность поглощения наночастиц размером 100 нм в 15-250 раз выше, чем более крупных микрочастиц (26), отложение хрома благодаря проникновению в цитоплазму (27) может увеличиваться за счет дефицита транспортного белка трансферрина и образования в 12-перстной, слепой и толстой кишке стабильных трудно адсорбируемых гидратов (28).

Введение НЧ Cr_2O_3 в рацион цыплят-бройлеров сопровождалось отсутствием окислительного стресса, на что указывала активность каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и концентрация малонового диальдегида (табл. 2) в сыворотке крови. В частности, на фоне снижения СОД во всех опытных группах достоверные различия ($p \leq 0,05$) с контролем были характерны для II группы (51,3 %), содержание КАТ было стабильно низким и уменьшалось в ответ на увеличение дозы НЧ Cr_2O_3 в рационе. Отсутствие токсичности и ростостимулирующий эффект НЧ Cr_2O_3 определялись нарастанием количества NO-метаболитов во II и III опытных группах соответственно на 18,8 и 9,2 % относительно контроля ($p \leq 0,05$). В других группах различия по сравнению с контрольной не превышали 5 %.

2. Активность каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), концентрация малонового диальдегида (МД) и NO-метаболитов в сыворотке крови у цыплят-бройлеров кросса Арбор Айкрес в зависимости от дозы наночастиц Cr_2O_3 в рационе ($M \pm SEM$, $n = 30$, опыт в условиях вивария, 42-е сут)

Показатель	Группа				
	контроль	I	II	III	IV
СОД, % ингибирования аутоокисления адреналина	568±68,6	405±57,0	277±18,6*	509±28,6	435±48,0
КАТ, мкмоль $H_2O_2 \cdot л^{-1} \cdot мин^{-1}$	2363±54,9	1050±82,8*	1871±51,38*	1510±47,4*	1116±64,1*
МД, нмоль/мл	0,65±0,260	0,36±0,006	0,41±0,120	0,29±0,090	0,18±0,040
NO-метаболиты, мкмоль/л	59,8±2,53	61,4±3,42	73,6±3,62*	65,8±1,51*	62,9±1,83

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

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

Различия в механизме действия НЧ хрома в разных дозировках приводили к неодинаковым изменениям биохимических показателей крови (табл. 3). Эффект НЧ Cr_2O_3 выражался в стимуляции активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) на 14-е сут. Так, активность АлАТ во II и IV группах была практически в 2 раза выше, чем в контроле ($p \leq 0,05$). Для АсАТ на 21-е сут достоверные различия были характерны для всех опытных групп (см. табл. 3).

3. Биохимические показатели сыворотки крови у цыплят-бройлеров кросса Арбор Айкрес на 21-е и 42-е сут в зависимости от дозы наночастиц Cr_2O_3 в рационе ($M \pm SEM$, $n = 30$, опыт в условиях вивария)

Показатель	Группа				
	контроль	I	II	III	IV
	На 21-е сут				
АлАТ, Ед/л	7,3±0,50	8,3±2,40	14,2±1,00***	7,1±3,20	13,2±1,70**
АсАТ, Ед/л	52,5±33,00	80,2±50,10*	190,4±76,90**	188,7±33,20**	106,4±20,00**
Глюкоза, ммоль/л	14,0±0,40	14,8±0,80	14,4±1,60	15,3±0,50	14,8±0,50
Холестерин, ммоль/л	3,0±0,10	3,4±0,20	2,9±0,60	2,7±0,30	3,2±0,30
Триглицериды, ммоль/л	0,6±0,20	0,6±0,20	1,6±0,20*	0,6±0,30	1,2±0,10*

Амилаза, Ед/л	436±19,1	422±195,1	303±64,1	403±25,7	617±42,9*
Липаза, Ед/л	6,4±0,30	7,2±0,30	6,8±0,30	7,9±0,80	8,3±2,40
На 42-е сут					
АлАТ, Ед/л	23,0±2,10	17,1±1,00	26,3±1,10	24,0±2,40	15,4±1,10
АсАТ, Ед/л	70,5±6,10	152,0±8,50***	63,8±7,80	69,4±13,70	116,6±20,90**
Глюкоза, ммоль/л	15,4±0,40	14,3±0,60	13,4±1,10	14,0±0,50	14,2±0,20
Холестерин, ммоль/л	3,8±0,30	3,3±0,10	3,0±0,30	3,1±0,30	3,9±0,40
Триглицериды, ммоль/л	0,6±0,10	0,4±0,20	0,3±0,10	1,1±0,30*	2,1±0,70*
Амилаза, Ед/л	173±5,6	180±5,6	157±10,4	166±1,2	186±1,2
Липаза, Ед/л	2,7±0,80	2,3±0,80	1,4±0,70	2,8±0,70	5,4±4,50**

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика». АлАТ — аланинаминотрансфераза, АсАТ — аспаргатаминотрансфераза.

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

К окончанию эксперимента активность АлАТ в сыворотки крови у цыплят-бройлеров (при статистически недостоверной разнице с контролем) снижалась в группах с минимальной и максимальной нагрузкой НЧ Cr_2O_3 , тогда как АсАТ — наоборот, увеличилась на 53,7 и 39,6 % ($p \leq 0,05$). Высокая активность эндогенных трансфераз может быть признаком нарушения функции печени, почек и поджелудочной железы, но, учитывая отсутствие маркеров воспаления (показатели СОД и КАТ), допустимо предположить, что метаболическая функция хрома связана с тонкими механизмами участия в стимулировании выработки хромодулина (LMWCCr) (29). Хромодулин акцептирует молекулы хрома, связанные биологическими молекулами, в том числе трансферрином, и стимулирует гепатопротекторную активность (30). Изменения показателей по глюкозе и холестерину при поступлении хрома с рационом мы не отмечали.

Маркером энергетического и липидного обмена служит концентрация в крови триглицеридов. На 21-е сут у бройлеров, получавших в составе рациона НЧ Cr_2O_3 в дозе 100 и 400 мкг/кг, этот показатель был больше соответственно на 61,6 и 48,5 % по сравнению с контролем. Эффект пролонгировался к концу учетного периода, что не подтверждает результаты исследований (31), где высокое содержание холестерина и триглицеридов было характерно для хромдефицитных состояний. Такая неоднозначная реакция организма, возможно, связана как с высокой биодоступностью наночастиц хрома, так и с перестройкой ферментативной системы (32).

Активность амилолитических ферментов в крови на 21-е сут оказалась наибольшей в IV группе, разница с контрольными значениями составила 29,5 % ($p \leq 0,05$). В других группах существенных отклонений не обнаружили. Аналогичная динамика была характерна для липазы. В группах, получавших наибольшие дозы НЧ Cr_2O_3 (200 и 400 мкг/кг), активность этого фермента на 21-е и 42-е сут оказалась на 19-30 % выше, чем в контроле. Увеличение активности сывороточных ферментов может быть результатом синтеза или ресинтеза микронутриентов, повышения проницаемости клеточных мембран и транслокации пищеварительных ферментов в кровяное русло (33).

Ряд авторов (33, 34) постулируют, что циркулирующие с кровотоком ферменты представляют собой депо для последующей рекреции поджелудочной железой. Второй механизм появления панкреатических гидролаз в крови — их резорбция из выводных протоков железы (так называемое уклонением ферментов), третий механизм — резорбция ферментов из тонкой кишки (35).

Гормоны и биологически активные вещества, вырабатываемые поджелудочной железой, необходимы для эффективного поглощения питательных веществ через слизистую оболочку кишечника. На 21-е сут для

ферментов поджелудочной железы был характерен рост активности липазы (до 96 % во всех опытных группах). Пик активности амилазы и протеазы соответствовал дозам НЧ Сг 100 и 400 мкг/кг ($p \leq 0,05$). Дозозависимая разница на 42-е сут эксперимента выражалась в ингибировании амилазы в диапазоне доз от 100 до 400 мкг/кг на фоне увеличения активности липазы и протеазы при низких и высоких концентрациях НЧ Сг (рис. 1).

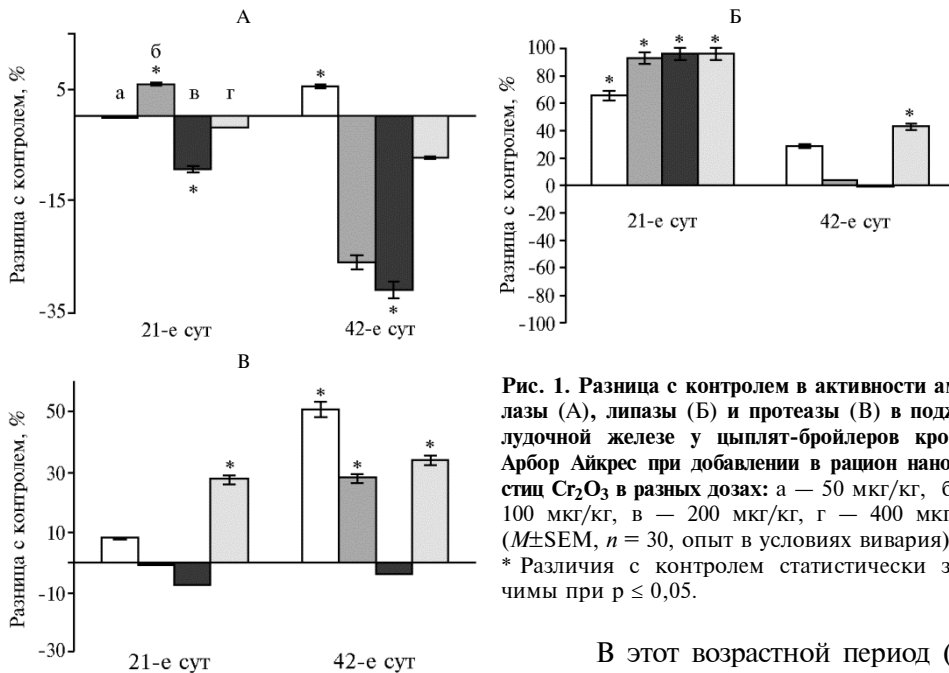


Рис. 1. Разница с контролем в активности амилазы (А), липазы (Б) и протеазы (В) в поджелудочной железе у цыплят-бройлеров кросса Арбор Айкрес при добавлении в рацион наночастиц Sr_2O_3 в разных дозах: а — 50 мкг/кг, б — 100 мкг/кг, в — 200 мкг/кг, г — 400 мкг/кг ($M \pm SEM$, $n = 30$, опыт в условиях вивария). * Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

В этот возрастной период (на 42-е сут эксперимента) функциональное напряжение инкреции ферментов под воздействием НЧ Сг обусловлено снижением активности амилазы и липазы в поджелудочной железе на фоне роста протеолитической активности. Реадсорбция ферментов в кровь, а затем в просвет тонкого кишечника рассматривается как возможная адаптация энтеропанкреатической регуляции в разные возрастные периоды (36). С этим механизмом, вероятно, связано наблюдаемое нами изменение активности ферментов в 12-перстной кишке на значения, диаметрально противоположные соответствующим показателям в поджелудочной железе.

Таким образом, мы показали, что у цыплят-бройлеров, потреблявших в составе рациона НЧ Сг, происходят дозозависимые разнонаправленные изменения активности пищеварительных ферментов в поджелудочной железе в разные возрастные периоды. Наши данные о модификации ферментативной активности в присутствии наночастиц согласуется с результатами, полученными другими авторами (37-39). В их опытах образование комплекса химотрипсина с НЧ селена способствовало смещению рН гидролитической активности в щелочную область с одновременным увеличением максимальной ферментативной активности в сравнении со свободным ферментом.

Эскалацию ферментов через кишечник с сохранением активности подтвердили результаты анализа помета (рис. 2). Активность амилазы в помете на 21-е сут снижалась, но возрастала к концу учетного периода. Активность липазы не изменялась в первый период и нарастала на 70-75 % на 42-е сут ($p \leq 0,05$). Активность протеазы, наоборот, была выше контроля на 21-е сут с последующим снижением к концу эксперимента.

На 21-е сут контрольная группа имела самое низкое значение рН кишечного содержимого, в то время как в других группах эта величина изменялась в пределах рН 4,62-7,53. На 42-е сут только в группе, получавшей НЧ Cr_2O_3 400 мкг/кг, показатель кислотности отличался от контрольного и составил рН 9,34. Сохранение и увеличение активности амилазы и липазы при таком рН может быть примером адаптации ферментов, а также их стабилизации наночастицами. Снижение активности амилазы в IV группе, вероятно, свидетельствует о чувствительности этого фермента к изменению кислотно-щелочного баланса среды.

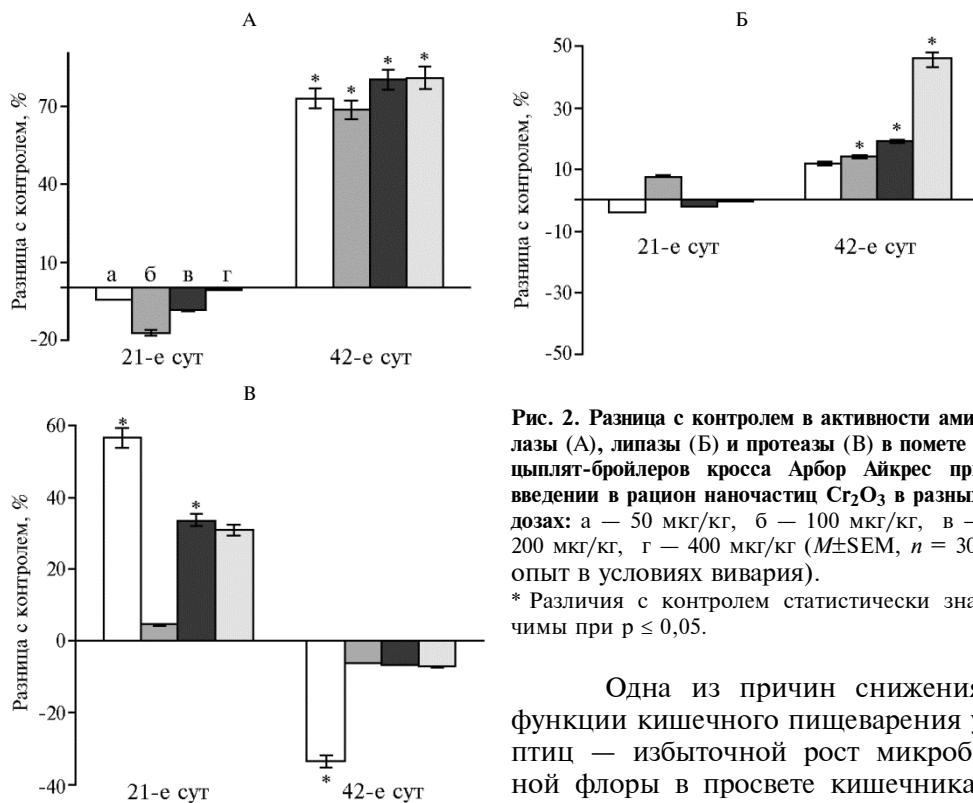


Рис. 2. Разница с контролем в активности амилазы (А), липазы (Б) и протеазы (В) в помете у цыплят-бройлеров кросса Арбор Айкрес при введении в рацион наночастиц Cr_2O_3 в разных дозах: а — 50 мкг/кг, б — 100 мкг/кг, в — 200 мкг/кг, г — 400 мкг/кг ($M \pm \text{SEM}$, $n = 30$, опыт в условиях вивария).

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

Одна из причин снижения функции кишечного пищеварения у птиц — избыточный рост микробной флоры в просвете кишечника, что приводит к снижению продвижения химуса и преждевременной де-

конъюгации первичных желчных кислот (40). Избыточная микробная флора может вызывать повреждения эпителия тонкой кишки, поскольку метаболиты некоторых микроорганизмов цитотоксичны. Определение численности микроорганизмов в слепой кишке бройлеров — важный этап мониторинга жизнеспособности организма (41). В слепой кишке бройлеров на 21-е сут в группе, получавшей 400 мкг Cr /кг корма, снижалось общее число микроорганизмов (на 88,4 %) ($p \leq 0,05$), численность энтеробактерий и бифидобактерий (соответственно на 28,0 и 65,4 %) ($p \leq 0,05$), а также возрастала представленность сальмонелл (на 21,7 %, $p \leq 0,05$) (табл. 4). При дозе 50 мкг/кг снижалась численность бифидобактерий и лактобактерий (соответственно на 35,6 и 53,8 %) ($p \leq 0,05$), доза 100 мкг/кг увеличивала количество энтеробактерий, но снижала число сальмонелл, 200 мкг/кг — способствовала росту численности стафилококков, энтеробактерий, сальмонелл, одновременно уменьшая число бифидобактерий и лактобактерий. На 42-е сут в I группе число бифидобактерий продолжало снижаться с одновременным сокращением численности стафилококков и сальмонелл.

Во II группе возрастало число энтеробактерий и снижалось — бифидобактерий. В III группе уменьшалась представленность бифидобактерий, в IV группе на 42-е сут (так же, как на 21-е сут) — энтеробактерий, бифидобактерий и сальмонелл.

4. Численность различных групп микроорганизмов в слепой кишке у цыплят-бройлеров кросса Арбор Айкрес на 21-е и 42-е сут в зависимости от дозы наночастиц Cr₂O₃ в рационе (M±SEM, n = 30, опыт в условиях вивария)

Группа	Общее микробное число	Стафил-лококки	Энтеро-бактерии	Сальмо-неллы	Бифидо-бактерии	Лакто-бактерии	Целлюлозоразла-гающие бактерии
На 21-е сут							
Контроль	37,6±3,20	0,5±0,10	8,9±0,60	15,0±0,70	6,2±0,40	1,4±0,20	0,9±0,20
I	40,0±5,10	0,9±0,10	11,7±1,20	16,5±0,80	4,0±0,30*	0,6±0,09*	1,1±0,40
II	44,8±2,30	1,3±0,20	12,8±1,20*	10,3±0,30*	6,6±0,50	0,9±0,20	0,8±0,20
III	42,6±3,10	2,3±0,20*	15,1±2,10*	20,2±1,40*	3,0±0,20*	0,2±0,01*	1,1±0,30
IV	4,1±0,60*	0,9±0,10	6,4±0,30*	19,2±1,00*	2,1±0,20*	1,7±0,40	0,5±0,10
На 42-е сут							
Контроль	48,6±4,10	3,1±0,60	15,1±0,60	2,5±0,30	31,0±2,60	67,0±5,90	2,1±0,30
I	56,1±4,90	1,2±0,10*	18,6±1,30	0,9±0,10*	20,0±2,90*	52,3±4,80	1,8±0,40
II	46,6±3,80	2,2±0,20	19,2±1,10*	0	20,7±2,50*	56,3±5,50	1,9±0,20
III	60,6±5,80	2,0±0,10	17,4±1,90	3,5±0,60	18,7±2,70*	52,3±5,30	2,3±0,30
IV	62,2±5,20	1,8±0,10	12,3±0,80*	0,7±0,20*	17,7±3,10*	62,2±6,80	2,2±0,40

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

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

В этом контексте наблюдаемый «энзиматический выброс» свидетельствует о нарушениях в микроэкологии кишечника, что обусловлено рядом причин: (усиленная перистальтика, измененный состав химуса, поступающего в толстый кишечник, гиперпродукция щелочных секретов при патологиях) (39). Известно, что под влиянием микробных протеолитических ферментов pH фекалий сдвигается в сторону щелочных значений, способствуя сохранению активности ферментов в кишечнике (38, 42, 43).

Множественные физиологические эффекты НЧ Cr, отмеченные ранее на крысах (44) и в настоящем исследовании на цыплятах-бройлерах, связаны с физико-химическими свойствами наночастиц, облегчающими их взаимодействие с биологическими объектами (45).

Итак, наночастицы Cr₂O₃ в рационе не токсичны, на что указывает отсутствие изменений в активности каталазы, супероксиддисмутазы и в накоплении малонового диальдегида. При этом хром действует как антиоксидант, повышая концентрации NO-метаболитов в сыворотке крови. Биологическая роль наночастиц хрома при включении в рацион цыплят-бройлеров в дозах 50 и 100 мкг/кг корма проявляется в стимулировании роста, выработки пищеварительных ферментов и снижении затрат корма. При высоких концентрациях НЧ в разные возрастные периоды (21-е сут и 42-е сут) происходило частичное подавление всасываемости пищеварительных ферментов в кровь и их активности в кишечнике (амилаза) при сохранении активности в помете (амилаза, липаза) за счет ослабления роста микроорганизмов (бифидобактерий, стафилококков и сальмонелл) и сдвига pH в щелочную сторону.

1ФГБНУ Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН,

460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,
e-mail: lsv74@list.ru, gavrish.irina.ogu@gmail.com ✉;

2ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет,

460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13,
e-mail: gubaidullinae@mail.ru;

*Поступила в редакцию
26 января 2019 года*

EFFECTS CAUSED BY DIFFERENT DOSES OF DIETARY CHROMIUM NANOPARTICLES FED TO BROILER CHICKENS

S.V. Lebedev^{1, 2}, I.A. Gavrish^{1, 2}, I.Z. Gubajdullina¹, S.V. Shabunin³

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

²Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia, e-mail gubaidullinae@mail.ru;

³All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, 114b, ul. Lomonosova, Voronezh, 394087 Russia, e-mail vnvipat@mail.ru

ORCID:

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

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

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

Shabunin S.V. orcid.org/0000-0002-2689-6998

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Ministry of Science and Education of the Russian Federation for basic research according to the program of RAS Presidium (Agreement No. 075-02-2019-1847)

Received January 26, 2019

doi: 10.15389/agrobiol.2019.4.820eng

Abstract

Chromium is important chemical element for humans and animals which essentiality is manifested in reducing the amount of glucose and cholesterol in blood, reducing body fat. Factors which influence the absorption of chromium are source, size and composition of diet. Reducing size of Cr particles allows one to increase absorption. Replacement of traditional sources of microelements for organic and ultrafine metal forms is prospective due to their surface area, higher reactivity and bioavailability. In this paper, we show for the first time that Cr₂O₃ nanoparticles (NPs) at doses of 50 to 100 µg/kg of feed have no toxic effect, improve productive performance through stimulation of digestive enzymes and have positive effect on accumulation of the element in broiler chicken carcass. Our goal was to estimate effects of various doses of dietary chromium nanoparticles on the activity of digestive enzymes, biochemical blood parameters and gut microbiota in Arbor Aikres broiler chickens (*Gallus gallus*) (OAO Orenburg Poultry Farm, 2018). Five groups of chickens were formed, control and test groups 1, 2, 3, and 4 ($n = 30$ each) with live weight from 160 to 180 g. The control birds during experiment (0-14-21-42 days) received the basic diet, the birds of groups 1, 2, 3, and 4 additionally received 50, 100, 200 and 400 µg/kg feed of dietary Cr₂O₃ NPs ($d = 91$ nm; Platina LLC, Moscow, Russia). Addition of 200-400 µg/kg Cr₂O₃ NPs increased body weight and improved feed conversion by 3.1-3.9 and 7-11 %, respectively ($p \leq 0.05$), compared to control. Cr incorporation into carcass was 28.2 and 25.6 % higher when broilers were fed with NPs at 200 and 400 µg/kg, respectively, while this index in droppings was 15 % lower. Increased $Cr_{\text{feed}}/Cr_{\text{droppings}}$ (1.5-2.5) and $Cr_{\text{feed}}/Cr_{\text{carcass}}$ (4.6-6.4) values in the test groups indicate better absorption of chromium in the gastrointestinal tract. Cr₂O₃ NPs caused higher activity of endogenous transferases, the alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. Catalase and superoxide dismutase activity remained unchanged as well as concentration of malonic dialdehyde. That is, chromium acts as antioxidant, with up to 18 % increase ($p \leq 0.05$) in blood NO-metabolites. Cr₂O₃ NPs stimulate activity of blood enzymes: by 29.5 % (group IV, $p \leq 0.05$) on day 21 for amylase, by 19-30 % (group III and IV, $p \leq 0.05$) on days 21 and 42 for lipase, followed by a decrease in lipolytic activity by the end of the experiment in the test groups compared to day. NPs of 50 and 400 µg/kg suppressed amylase and activated lipase and protease in the duodenal chymeduction, with an increase in pH of the intestinal contents from 4.62 to 9.34 in all test groups. In droppings, digestive enzymes showed a reverse trend. Dietary Cr₂O₃ NPs at 50 µg/kg decreased the number of bifidobacteria, staphylococci and Salmonella in droppings, at 100 µg/kg increased the counts of enterobacteria, and at 400 µg/kg, on the contrary, reduced enterobacteria by 20 %, with simultaneous restriction Salmonella abundance in the cecum. Dietary Cr₂O₃ NPs decreased bifidobacteria. Thus, the dietary Cr₂O₃ NPs at 50-100 µg/kg has more pronounced positive effect and can be used as a chromium additive for poultry (for example, in pre-mixes or vitamin-mineral complexes).

Keywords: chicken-broilers, antioxidant enzymes, Cr, productivity, concentration of Cr, biochemical parameters of blood, digestive enzymes.

REFERENCES

1. National research council. *Mineral tolerance of animals. Second revised edition.* National Academy Press, Washington DC, 2005 (doi: 10.17226/11309).
2. Anderson R.A., Bryden N.A., Polansky M.M. Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1997, 16: 273-279 (doi: 10.1080/07315724.1997.10718685).
3. Simonoff M., Llabador Y., Hamon C., Peers A.M., Simonoff G.N. Low plasma chromium in patients with coronary artery and heart diseases. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1984, 6: 431-439 (doi: 10.1007/BF02989260).
4. Anderson R.A. Chromium. In: *Trace elements in human and animal nutrition. 5th edition.* Academic Press, San Diego, CA, 1987.
5. Linder M.C. Nutrition and metabolism of the trace elements. In: *Nutritional biochemistry and metabolism: with clinical applications.* M.C. Linder (ed.). Prentice Hall, NY, 1991.
6. Onderci M., Sahin K., Sahin N., Cikim G., Vijaya J., Kucuk O. Effects of dietary combination of chromium and biotin on growth performance, carcass characteristics, and oxidative stress markers in heat-distressed Japanese quail. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2005, 106(2): 165-176 (doi: 10.1385/BTER:106:2:165).
7. National Research Council. *Nutrient Requirements of Swine. 10th revised edition.* National Academy Press, Washington DC, 1998 (doi: 10.17226/6016).
8. Doisy R.J., Streeten D.H.P., Souma M.L., Kalafer M.E., Rekant S.L., Dalakos T.G. *Metabolism of chromium 51 in human subjects* (Vol. 155). Marcel Dekker, NY, 1971.
9. Oberlis D., Kharland B., Skal'nyi A. *Biologicheskaya rol' makro- i mikroelementov u cheloveka i zhivotnykh* [Biological role of macro- and microelements in human and animals]. St. Petersburg, 2008 (in Russ.).
10. Moeini M.M., Bahrami A., Ghazi S., Targhibi M.R. The effect of different levels of organic and inorganic chromium supplementation on production performance, carcass traits and some blood parameters of broiler chicken under heat stress condition. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 144(1-3): 715-724 (doi: 10.1007/s12011-011-9116-8).
11. Ban C., Park S.J., Lim S., Choi S.J., Choi Y.J. Improving flavonoid bioaccessibility using an edible oil-based lipid nanoparticle for oral delivery. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63(21): 5266-5272 (doi: 10.1021/acs.jafc.5b01495).
12. 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: 1118-1122 (doi: 10.5713/ajas.2004.1118).
13. 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).
14. Motozono Y., Hatano K., Sugawara N., Ishibashi T. Effects of dietary chromium picolinate on growth, carcass quality and serum lipids of female broilers. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 1998, 69(7): 659-665 (doi: 10.2508/chikusan.69.659).
15. Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. *Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb* [Digestion and adaptations in fish]. Moscow, 1993 (in Russ.).
16. Ugolev A.M. *Membrannoe pishchevarenie: polisubstratnye protsessy, organizatsiya i regulyatsiya* [Membrane digestion: polysubstrate processes, organization and regulation]. Moscow, 1972 (in Russ.).
17. *Metodicheskie rekomendatsii po kormleniyu sel'skokhozyaistvennoi ptitsy* /Pod redaktsiei V.I. Fisnina [Poultry feeding — guidelines. V.I. Fisnin (ed.)]. Sergiev Posad, 2009 (in Russ.).
18. Lie 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).
19. 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. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2002, 89(1): 53-64 (doi: 10.1385/BTER:89:1:53).
20. Batoev Ts.Zh. *Sbornik nauchnykh trudov Buryatskogo SKHI (Ulan-Ude)*, 1971, 25: 122-126 (in Russ.).
21. Gaziumarova L.D., Titov L.P., Klyuiko N.L. *Bakteriologicheskaya diagnostika disbakterioza kishchechnika: instruktsiya po primeneniyu* [Bacteriological diagnosis of intestinal dysbiosis]. L.-Minsk, 2010 (in Russ.).
22. Sizova E.A., Miroshnikov S.A., Lebedev S.V., Kudasheva A.V., Ryabov N.I. To the development of innovative mineral additives based on alloy of Fe and Co antagonists as an example. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(4): 553-562 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.4.553eng).
23. Sizova E.A., Miroshnikov S.A., Lebedev S.V., Levakhin Y.I., Babicheva I.A., Kosilov V.I. Comparative tests of various sources of microelements in feeding chicken-broilers. *Sel'skokhozyaistvennaya*

- biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(2): 393-403 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.393eng).
24. Egorov I.A., Petrosyan A., Andrianova E.N. *Pitsevodstvo*, 2001, 12: 3-5 (in Russ.).
 25. Samanta S., Haldar S., Ghosh T.K. Production and carcass traits in broiler chickens given diets supplemented with inorganic trivalent chromium and an organic acid blend. *British Poultry Science*, 2008, 49(2): 155-163 (doi: 10.1080/00071660801946950).
 26. Sahoo S.K., Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 2003, 8(24): 1112-1120 (doi: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9).
 27. Davda J., Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 233(1-2): 51-59 (doi: 10.1016/S0378-5173(01)00923-1).
 28. Oberleas D., Harland B.F. Impact of phytic acid on nutrient availability. In: *Phytase in animal nutrition and waste management*. N.Y., 1996.
 29. Vincent J.B. The biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(4): 715-718 (doi: 10.1093/jn/130.4.715).
 30. Clodfelder B.J., Emamaullee J., Hepburn D.D., Chakov N.E., Nettles H.S., Vincent J.B. The trail of chromium (III) in vivo from the blood to the urine: the roles of transferrin and chromodulin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2001, 6(5-6): 608-617 (doi: 10.1007/s007750100238).
 31. Striffler J.S., Polansky M.M., Anderson R.A. Overproduction of insulin in the chromium-deficient rat. *Metabolism*, 1999, 48(8): 1063-1068 (doi: 10.1016/S0026-0495(99)90207-X).
 32. Anderson R.A., Kozlovsky A.S. Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1985, 41(6): 571-577 (doi: 10.1093/ajcn/41.6.1177).
 33. Rothman S., Liebow C., Isenman L.C. Conservation of digestive enzymes. *Physiol. Rev.*, 2002, 82(1): 1-18 (doi: 10.1152/physrev.00022.2001).
 34. Kawabata A., Matsunami M., Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 153(Suppl. 1): S230-S240 (doi: 10.1038/sj.bjp.0707491).
 35. Ransberger K. *Teoriya sistemnoi enzimoterapii. Opyt i perspektivy sistemnoi enzimoterapii* [Theory of systemic enzymotherapy: experience and prospects]. Krasnoyarsk, 2003 (in Russ.).
 36. Fisinin V.I., Egorov I.A., Vertiprakhov V.G., Grozina A.A., Lenkova T.N., Manukyan V.A., Egorova T.A. Activity of digestive enzymes in duodenal chymus and blood in broilers of parental lines and the meat cross depending on dietary bioactive additives. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(6): 1226-1233 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1226eng).
 37. Ershov D.Yu., Kipper A.I., Borovikova L.N., Garkushina I.S., Matveeva N.A., Pisarev O.A. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2011, 6(11): 923-925 (in Russ.).
 38. Tahami Z., Hosseini S.M., Bashtani M. Effect of organic acids supplementation on some gastrointestinal tract characteristics and small intestine morphology of broiler chickens. *Anim. Prod. Res.*, 2014, 3(3): 1-9.
 39. Dzagurov B.A., Zhuravleva I.O., Ktsoeva Z.A.. *Izvestiya Gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2013, 3(50): 131-133 (in Russ.).
 40. Kuvaeva I.B. *Obmen veshchestv organizma i kishhechnaya microflora* [Metabolism and intestinal microflora]. Moscow, 1976 (in Russ.).
 41. Miller K.P., Wang L., Benicewicz B.C., Decho A.W. Inorganic nanoparticles engineered to attack bacteria. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44(21): 7787-7807 (doi: 10.1039/c5cs00041f).
 42. Arakha M., Pal S., Samantarrai D., Panigrahi T.K., Mallick B.C., Pramanik K., Jha S. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14813 (doi: 10.1038/srep14813).
 43. Feng Z.V., Gunsolus I.L., Qiu T.A., Hurley K.R., Nyberg L.H., Frew H., Torelli M.D. Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Chem. Sci.*, 2015, 6(9): 5186-5196 (doi: 10.1039/c5sc00792e).
 44. Lebedev S.V., Gavrish I.A., Gubaidullina I.Z. Different chrome sources influence on morpho-biochemical indicators and activity of digestive enzymes in Wistar rats. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2019, 54(2): 304-315 (doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.304eng).
 45. Slepicka P., Kasalkova N.S., Siegel J., Kolska Z., Bacakova L., Svorcik V. Nano-structured and functionalized surfaces for cytocompatibility improvement and bactericidal action. *Biotechnology Advances*, 2015, 6(33): 1120-1129 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.001).