

УДК 636.084.1:636.085.57

Влияние наночастиц хрома на активность пищеварительных ферментов и морфологические и биохимические параметры крови телёнка

**С.В. Лебедев^{1,2}, О.В. Кван^{1,2}, И.З. Губайдуллина¹, И.А. Гавриш¹, В.В. Гречкина^{1,3},
Б. Момчилович⁴, Н.И. Рябов¹**

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»

² ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»

³ ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет»

⁴ Institute of Sustainable Ecosystem Research and Development

Аннотация. Хром является важным химическим элементом для человека и животных, его эссенциальность проявляется в снижении уровня глюкозы и холестерина в крови, жировых отложений, в стимуляции развития мышечной ткани. Недостаточное поступление хрома в организм, связанное с типом и качеством питания, сопровождается замедлением роста и ухудшением толерантности к глюкозе.

Тем не менее отчёты о влиянии различных источников хрома на активность пищеварительных энзимов у животных встречаются редко. Из имеющихся немногочисленных исследований известно, что поджелудочная железа способна адаптироваться к характеру питания путём изменения состава своего секрета соответственно характеру потребляемой пищи.

Целью исследования являлось изучение влияния наночастиц хрома в дозе 300 мг/кг корма на активность пищеварительных ферментов химуса и гематологические показатели у телят красной степной породы в возрасте 6 месяцев, массой 110±10 кг. Благодаря уникальной хирургической операции по выведению дуоденального анастомоза получены новые знания об активности пищеварительных ферментов химуса. Отбор проб химуса проводился в течение 3 суток натощак перед кормлением, через 1 и 3 часа после кормления.

Экспериментально установлено, что наночастицы хрома нетоксичны, оказывают разнонаправленное действие на гематологические показатели и обмен веществ в организме телят. Это выразилось в увеличении концентрации глюкозы на 10,6 % ($P \leq 0,05$), триглицеридов – на 14,3 %, на фоне снижения общего белка на 9,6 и холестерина – на 16,9 %.

Снижение активности амилазы после приёма корма сопровождалось увеличением показателей протеазы и липазы дуоденального химуса, как элемент включения адаптационных механизмов для поддержания гомеостаза липидного и белкового обменов.

Ключевые слова: телята, хром, секреторная функция дуоденального химуса, амилаза, липаза, протеаза, гематология крови.

Введение.

Хром является важным химическим элементом для человека и животных, его эссенциальность [1], проявляется в снижении уровня глюкозы и холестерина в крови, жировых отложений и в стимуляции развития мышечной ткани [2]. Недостаточное поступление хрома в организм, связанное с типом и качеством питания, сопровождается замедлением роста и ухудшением толерантности к глюкозе [3].

В настоящее время ведётся поиск альтернативных источников микроэлементов, обладающих низкой токсичностью и высоким биологическим действием. Перспективность замены традиционных источников микроэлементов на органические и ультрадисперсные формы металлов определяется наличием у последних высокой удельной площади поверхности, большей реакционной способности и биодоступности [4-8].

Важным инструментом в регуляции обмена поступившего хрома в организм является его способность проникать через кишечную стенку. Эффективность всасывания хрома зависит от размера его молекулы и наличия пищеварительных агентов (витамины, фитаты, аминокислоты) [9]. Тем не менее, исследования о влиянии различных источников хрома на активность пищеварительных энзимов у животных встречаются редко. Из имеющихся немногочисленных исследований известно, что поджелудочная железа способна адаптироваться к характеру питания путём изменения состава своего секрета соответственно характеру потребляемой пищи.

В этой связи перспективным направлением является изучение возможности использования наночастиц хрома в качестве модуляторов активности пищеварительных ферментов.

Цель исследования.

Изучение влияния наночастиц хрома на активность пищеварительных ферментов дуоденального химуса и гематологические показатели у телят.

Материалы и методы исследования.

Объект исследования. 2 телёнка красной степной породы со средней массой 110-120 кг, в возрасте 6 мес.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями Russian Regulations, 1987 (Order No. 755 on 12.08.1997 the USSR Ministry of Health) and «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D. C. 1996)». При выполнении исследований были предприняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Схема эксперимента. Исследования выполнены в лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН) и экспериментальной биологической клинике ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет». Телята содержались в специализированной клетке со свободным доступом к воде и корму. Основной рацион (ОР) был сбалансирован по основным питательным веществам согласно детализированным нормам ВНИИМС и включал сено разнотравное (2,5 кг), паточку кормовую (0,3 кг) и комбикорм (1,5 кг), состоящий из пшеницы, ячменя, рыбной муки и минеральных добавок (премикс ПК-60, соль поваренная, дикальцийфосфат).

Для осуществления поставленной задачи животным была проведена оригинальная операция по наложению дуоденального анастомоза [10].

К фистуле из изолированного отрезка прикрепляли с помощью специального резинового переходника шприц для сбора химуса 12-перстной кишки. Отбор химуса проводили утром до кормления натошак после 12-часового голодания и через 1 и 3 часа после кормления. Повторность опыта – 3 суток по каждому виду корма.

Согласно литературным данным, в дозах от 200 до 300 мкг/кг корма хром обладает наиболее выраженным биологическим действием на физиологические и ростовые показатели животных [11, 12]. Контрольное животное получало основной рацион, в рацион опытного животного дополнительно вводили наночастицы хрома в дозе 300 мг/кг.

Наночастицы (НЧ) хрома получены методом плазмохимического синтеза (ООО «Платина», г. Москва). Препараты НЧ Cr_2O_3 ($d=91$ нм, удельная поверхность – 9 м²/г, Z-потенциал – $93\pm 0,52$ мВ) содержали 99,8 % Cr. Перед включением в рацион наночастицы диспергировали в физиологическом растворе с помощью УЗДН-2Т («НПП Академприбор», Россия) (35 кГц, 300 Вт, 10 мкА, 30 мин). В комбикорм вводили методом ступенчатого смешивания.

Кровь отбирали из яремной вены в вакуумные пробирки с добавлением антикоагулянта, для биохимических показателей – в вакуумные пробирки с активатором свертывания (тромбин).

Все эксперименты проводились в 15-кратной повторности.

Оборудование и технические средства. Лабораторные исследования проводились в центре «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» и Испытательном центре ЦКП ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (аттестат аккредитации № RA.RU.21ПФ59 от 02.12.2015 г.).

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).

Измерение активности панкреатических ферментов проводилось: определение амилазы – по Смит-Рою в модификации для определения высокой активности фермента [13], протеаз – по гидролизу казеина очищенного по Гаммерстону при калориметрическом контроле (длина волны – 450 нм), липазы – на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих биохимических наборов для ветеринарии ДиаВет-Тест (Россия).

Статистическая обработка. Статистическая обработка включала расчёт среднего значения (M) и стандартные ошибки среднего (\pm SEM). Достоверность различий сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента. Уровень значимой разницы был установлен на $P < 0,05$.

Результаты исследования.

Влияние Cr на организм телят проявилось в установленном гипергликемическом эффекте, выраженном в увеличении глюкозы на 10,6 % ($P \leq 0,05$) у опытного животного по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Триглицериды, как истинные жиры, увеличились на 14,3 % при снижении уровня холестерина на 16,9 % ($P \leq 0,05$).

Таблица 1. Биохимические показатели крови телят

Показатели	Телята	
	контрольный	опытный
Глюкоза, моль/л	5,08 \pm 3,2	5,68 \pm 2,8
Общий белок, г/л	105,5 \pm 11,2	95,6 \pm 9,3*
АЛТ, ед./л	19,4 \pm 6,2	17,4 \pm 8,2
АСТ, ед./л	64,1 \pm 9,4	59,1 \pm 8,1*
Холестерин, моль/л	1,54 \pm 0,8	1,28 \pm 0,6*
Триглицериды, ммоль/л	0,18 \pm 0,009	0,21 \pm 0,018*
Щелочная фосфатаза, ед./л	83 \pm 18,4	82 \pm 21,4
Железо, мкмоль/л	17,1 \pm 3,1	14,6 \pm 6,2
Магний, моль/л	0,75 \pm 0,06	0,72 \pm 0,08

Примечание: * – результаты являются статистически достоверными ($P \leq 0,05$)

В то же время дополнительное включение в состав комбикормов НЧ хрома в дозе 300 мкг/кг корма привело к депрессированию белкового обмена, выраженному в снижении уровня общего белка в опытной группе на 9,6 % ($P \leq 0,05$).

Анализ реакции аминотрансфераз как индикатора наличия повреждения в клетках установил снижение активности АСаТ и АЛаТ в опытной группе на 10,4 и 7,9 % соответственно. Показатели щелочной фосфатазы и магния в группах были практически на одном уровне, на фоне снижения железа на 14,7 % по сравнению с контрольными значениями.

Учитывая сложные механизмы пищеварения у крупного рогатого скота, нельзя исключать участия хрома в обменных процессах, что было продемонстрировано динамикой активности пищеварительных ферментов в химусе (табл. 2).

Таблица 2. Активность ферментов дуоденального химуса у телят (M±m)

Показатели	Время отбора		
	до кормления	после 1 ч	после 3 ч
Амилаза, ед./л			
1 день	<u>4,8±0,61</u> 5,9±0,52*	<u>3,3±0,32</u> 3,76±0,21	<u>0,9±0,07</u> 2,1±0,06*
2 день	<u>6,9±0,56</u> 7,3±0,73	<u>4,8±0,64</u> 4,66±0,33	<u>2,1±0,04</u> 1,3±0,08
3 день	<u>9,21±0,8</u> 14,28±1,2*	<u>4,3±0,28</u> 5,2±0,01	<u>1,4±0,07</u> 3,9±0,07
Протеаза, ед./л			
1 день	<u>2,2±0,3</u> 2,91±0,3	<u>2,6±0,3</u> 3,02±0,86	<u>1,4±0,05</u> 1,9±0,04
2 день	<u>3,2±0,42</u> 5,1±0,4*	<u>3,1±0,3</u> 5,42±0,72*	<u>1,8±0,3</u> 3,1±0,2
3 день	<u>2,4±0,3</u> 2,27±0,2	<u>2,1±0,21</u> 2,35±0,17	<u>1,1±0,08</u> 1,37±0,09
Липаза, ед./л			
1 день	<u>0,17±0,04</u> 0,18±0,02	<u>0,32±0,03</u> 0,57±0,08	<u>0,12±0,01</u> 0,14±0,02
2 день	<u>0,21±0,02</u> 0,32±0,05	<u>0,43±0,05</u> 0,72±0,03*	<u>0,21±0,02</u> 0,17±0,03
3 день	<u>0,67±0,09</u> 1,15±0,04*	<u>0,23±0,04</u> 0,16±0,004	<u>0,18±0,03</u> 0,28±0,05*

Примечание: в числителе – показатели контрольного животного,
в знаменателе – опытного животного;

* – результаты являются статистически достоверными ($P \leq 0,05$)

Экспериментальные данные свидетельствуют, что наибольшая активность протеазы и липазы установлена в первые часы отбора, с последующим её снижением на 3 час. Добавление хрома в рацион бычков стимулировало активность протеазы во все учётные периоды, разница с контролем составила от 25 до 43 % ($P \leq 0,05$). Характерным является усиление активности протеазы на 2 день эксперимента, с последующим снижением её активности на 3 сутки. Аналогично этому формировалась и активность липазы, разница с контролем составила 36 % ($P \leq 0,05$). Активность амилазы, наоборот, уменьшалась в почасовых точках отбора и увеличивалась в суточном отборе у опытного животного.

Обсуждение полученных данных

При добавлении Cr возникали двусмысленные реакции в гематологических показателях, что выражалось в установленном гипергликемическом эффекте, снижении концентрации холестерина, что по результатам исследований [14] характерно для высоких доз хрома.

Триглицериды, как истинные жиры, увеличились на 14,3 %, что свидетельствует о влиянии хрома на липидный обмен, вызывающего расщепление избыточного жира в организме, что подтверждается исследованиями [15]. Однако существует и обратный эффект, который выражается в увеличении холестерина и снижении концентрации триглицерида после 12 недель добавок 200 мкг хрома [16].

Снижение активности аминотрансфераз, с одной стороны, может свидетельствовать об отсутствии токсического действия наночастиц хрома на организм, с другой, о нарушении белоксинтезирующей функции печени, что подтверждается снижением уровня белка в плазме крови опыт-

ного телёнка. В то же время активность протеазы и липазы в дуоденальном химусе увеличилась за счёт возможного включения адаптационных механизмов для поддержания гомеостаза липидного и белкового обменов.

Интересны данные, касающиеся содержания Fe в крови: если при низких уровнях концентрации хром и железо преимущественно занимают различные сайты связывания [17], то при более высоких они конкурируют за эти сайты, что проявилось в снижении метаболизма железа в опытной группе.

Выводы.

Наночастицы хрома нетоксичны, оказывают разностороннее действие на гематологические показатели и обмен веществ в организме телят. Это выражается в снижении белкового и стимуляции углеводного и липидного обменов. Добавление Cr в рацион телят сопровождается увеличением концентрации глюкозы на 10,6 % ($P \leq 0,05$), триглицеридов – на 14,3 %, на фоне снижения холестерина на 16,9 %.

Нарушение белоксинтезирующей функции печени выражалось в снижении уровня белка в плазме крови телят опытной группы на 9,6 %. Снижение активности амилазы сопровождалось увеличением показателей протеазы и липазы дуоденального химуса как элемента включения адаптационных механизмов для поддержания гомеостаза липидного и белкового обменов.

Исследования выполнены в соответствии с планом НИР на 2018-2020 гг. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (№ 0761-2018-0031)

Литература

1. Campbell W.J., Mertz W. Interaction of insulin and chromium (III) on mitochondrial swelling // American Journal of Physiology-Legacy Content. 1963. 204(6). P. 1028-1030.
2. Mertz W., Roginski E.E. Chromium metabolism: the glucose tolerance factors // American Journal of Clinical Nutrition. 1971. 33. P. 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. V. 24(2). P. 45-49.
4. Вишняков А.И., Ушаков А.С., Лебедев С.В. Особенности костномозгового кроветворения при введении наночастиц меди *per os* и *intramusculary* // Вестник мясного скотоводства. 2011. Вып. 64(2). С. 96-102.
5. Влияние микроэлементов на структурно-функциональное состояние яичников в условиях эксперимента / С.В. Лебедев, Е.С. Барышева, В.С. Полякова, Н.В. Малышева // Морфология. 2006. Т. 129. № 4. С. 74-75.
6. Нестеров Д.В. Сипайлова О.Ю., Лебедев С.В. Влияние сульфата и микрочастиц цинка на обмен токсических элементов в костной ткани цыплят бройлеров // Вестник Оренбургского государственного университета. 2012. № 142. С. 176-179.
7. Показатели неспецифической реакции адаптации лабораторных животных с различным уровнем функции щитовидной железы / С.В. Мирошников, С.В. Лебедев, А.А. Барабаш и др. // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 1(120). С. 141-143.
8. Influence of various chromium compounds on physiological, morpho-biochemical parameters, and digestive enzymes activity in Wistar rats / Svyatoslav Lebedev, Irina Gavrish, Elena Rusakova, Olga Kvan, Ilmira Gubaidullina // Trace Elements and Electrolytes. 2018. Vol. 35. Issue 4. P. 242-245.
9. Evans G.W., Bowman T.D. Chromium picolinate increases membrane fluidity and rate of insulin internalization // Journal of inorganic biochemistry. 1992. Vol 46. P. 134-156.
10. Синещёков А.Д. Процессы питания и нервная регуляция их у сельскохозяйственных животных // Тезисы докладов VIII Всесоюзного съезда физиологов, биохимиков, фармакологов. Киев, 1955. 736 с.

11. Effects of chromium nanocomposite supplementation on blood metabolites, endocrine parameters and immune traits in finishing pigs / M.Q. Wang, Z.R. Xu, L.Y. Zha, M.D. Lindemann // *Animal feed science and technology*. 2007. 139(1-2). P. 69-80.

12. Efficacy of chromium (III) supplementation on growth, body composition, serum parameters, and tissue chromium in rats / L.Y. Zha, M.Q. Wang, Z.R. Xu, L.Y. Gu // *Biological Trace Element Research*. 2007. 119. P. 42-50.

13. Вертипрахов В.Г. Особенности секреторной функции поджелудочной железы цыплят-бройлеров и возможности коррекции пищеварения животных ферментными препаратами на цеолитовой основе: дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2004. P. 59-60.

14. Chromium metabolism in man and biochemical effects. In *Trace Elements in Human Health and Disease* / R.J. Doisy, D.H.P. Streeten, J.M. Freiberg, A.J. Schneider // *Essential and Toxic Elements*. 1976. Vol. 2. P. 79-104.

15. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes / R.A. Anderson, N. Cheng, N.A. Bryden, M.M. Polansky, N. Cheng // *Diabetes*. 1997. 46. P. 1786-1791.

16. Riales R., Albrink M.J. Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1981. 34. P. 2670-2678.

17. Sargeant T., Lim T.H., Jenson R.L. Reduced chromium retention in patients with hemochromatosis: a possible basis of hemochromatotic diabetes // *Metabolism*. 1979. 28. P. 70-79.

Лебедев Святослав Валерьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», г. Оренбург, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29; профессор кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, пр. Победы, д. 13, сот.: 8-912-345-87-38, e-mail: lsv74@list.ru

Кван Ольга Вилорьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», г. Оренбург, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29; научный сотрудник экспериментально-биологической клиники ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, пр. Победы, д. 13, тел.: 8-912-345-87-38, e-mail: kwan111@yandex.ru

Губайдуллина Ильмира Закиевна, научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», 460000 г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, сот.: 8-912-843-10-69, e-mail: gubaidullinae@mail.ru

Гречкина Виктория Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29; доцент кафедры незаразных болезней животных ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет», 460000, г. Оренбург, ул. Челюскинцев 18, тел.: 8-922-877-14-97, e-mail: Viktoria1985too@mail.ru

Гавриш Ирина Александровна, научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», 460000 г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, e-mail: gavrish.irina.ogu@gmail.com

Momčilović Berislav, доктор медицинских наук, Институт исследований и развития устойчивых экосистем, Srebrnjak 59, 10 000 Zagreb, Croatia (Загреб, Хорватия)

Рябов Николай Иванович, доктор сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник отдела технологии мясного скотоводства и производства говядины ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)43-46-78

Поступила в редакцию 12 ноября 2018 года

UDC 636.084.1:636.085.57

Lebedev Svyatoslav Valeryevich^{1,2}, Kvan Olga Vilorievna^{1,2}, Gubaidullina Ilmira Zakievna¹, Gavrish Irina Alexandrovna¹, Grechkina Victoria Vladimirovna^{1,3}, Momčilović Berislav⁴, Ryabov Nikolai Ivanovich¹

¹ FSBSI «Federal Research Center for Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences», e-mail: lsv74@list.ru

² FSBEI HE «Orenburg State University», e-mail: kvan111@yandex.ru

³ FSBEI HE «Orenburg State Agrarian University», e-mail: Viktorial985too@mail.ru

⁴ Institute of Sustainable Ecosystem Research and Development

Effect of chromium nanoparticles on digestive enzymes activity and morphological and biochemical parameters of calf blood

Summary. Chromium is an important chemical element for humans and animals, its essentiality is expressed in the reduction of blood glucose and cholesterol levels, fat deposits, in stimulating of muscle tissue development. Insufficient intake of chromium in the body, associated with the type and quality of food, is accompanied by a slowdown in growth and a deterioration in tolerance to glucose.

Nevertheless, reports on the effect of various chromium sources on the digestive enzymes activity in animals are rare. From the few studies available it is known that the pancreas is able to adapt to the nutrition nature by changing composition of its secret according to the consumed food nature.

The purpose of the study was to research the effect of chromium nanoparticles at a dose of 300 mg/kg of fodder on the chyme digestive enzymes activity and on hematological parameters in Red Steppe calves aged 6 months, weighing 110±10 kg. Due to a unique surgical operation to remove the duodenal anastomosis, new information about the chyme digestive enzymes activity was obtained. Chyme sampling was carried out for 3 days on an empty stomach before feeding, after 1 and 3 hours after feeding.

It was established experimentally that chromium nanoparticles are non-toxic, have a versatile effect on hematological parameters and metabolism in the calves body. This was expressed in the glucose concentration increase by 10.6 % ($P \leq 0.05$), triglycerides – by 14.3 %, against the background of decrease in total protein by 9.6 and in cholesterol – by 16.9 %.

The decrease in amylase activity after feeding was accompanied by an increase in the protease and lipase levels of the duodenal chyme, as an element of adaptation mechanisms activation for maintaining homeostasis of lipid and protein metabolism.

Key words: calf, chromium, duodenal chyme secretory function, amylase, lipase, protease, blood hematology.