



Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Akademicka 13
20-950 Lublin

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

dr Anna Katarzyna Stępniewska
Katedra Biochemii i Toksykologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wniosek

z dnia 20.03.2023 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie **nauk rolniczych** w dyscyplinie **zootechnika i rybactwo**.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego:

Cykl jednotematycznych publikacji naukowych pt. „Poziom wybranych hormonów i składników mineralnych w organizmie szczura i kurcząt zależny jest od zastosowanej formy chromu w diecie”.

Wnioskuje – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu ~~tajnym~~/jawnym*¹

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rod.html

.....
(podpis wnioskodawcy)

¹ * Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

Załącznik 1 - Dane wnioskodawcy

Załącznik 2- Kopia dyplomu doktora

Załącznik 3- Autoreferat

Załącznik 4- Wykaz osiągnięć naukowych

Załącznik 5- Kopie publikacji zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe

Załącznik 6- Oświadczenia współautorów



PODPIS ZAUFANY

ANNA KATARZYNA
STĘPNIOWSKA

20.03.2023 13:51:35 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Załącznik nr 3

**AUTOREFERAT
OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ
NAUKOWYCH, DYDAKTYCZNYCH,
ORGANIZACYJNYCH ORAZ
POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ**

dr Anna Katarzyna Stępniewska

KATEDRA BIOCHEMII I TOKSYKOLOGII

WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI

UNIwersytet PRZYRODNICZY W LUBLINIE

ul. Akademicka 13,

20-950 Lublin

e-mail: anna.stepniowska@up.lublin.pl

Lublin 2023

I. DANE OSOBOWE

Imię i nazwisko	Anna Katarzyna Stępniewska
Miejsce pracy	Katedra Biochemii i Toksykologii Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Akademicka 13 20-950 Lublin
Dane kontaktowe	Tel. 81 445 69 16

II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

25.09.2012 r.	doktor nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, specjalność: chemia analityczna; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; Wydział Chemii; tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza strippingowa wybranych pierwiastków toksycznych z uwzględnieniem ich specjacji”; promotor: prof. dr hab. Mieczysław Korolczuk
30.06.2008 r.	magister; kierunek studiów – chemia; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; Wydział Chemii; tytuł pracy magisterskiej: „Oznaczanie kadmu i amarantu metodą analizy strippingowej z zastosowaniem błonkowej elektrody ołowiowej”; promotor: prof. dr hab. Mieczysław Korolczuk

III. DOTYCHCZASOWE ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

2013- obecnie	adiunkt w Katedrze Biochemii i Toksykologii Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
2012-2013 r.	asystent w Katedrze Biochemii i Toksykologii Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

**IV. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE WYNIKAJĄCE Z ART. 219 UST. 1 PKT. 2b
USTAWY PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE
(Dz.U.2018.0.1668 - USTAWA Z DNIA 20 LIPCA 2018 r.)**

**A. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO „POZIOM WYBRANYCH
HORMONÓW I SKŁADNIKÓW MINERALNYCH W ORGANIZMIE
SZCZURA I KURCZĄT ZALEŻNY JEST OD ZASTOSOWANEJ FORMY
CHROMU W DIECIE”**

B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

I.1. Stępniewska A., Tutaj K., Juśkiewicz J., Ognik K. Effect of a high-fat diet and chromium on hormones level and Cr retention in rats. <i>J. Endocrinol. Invest.</i> 2022, 45, 527-535. DOI: 10.1007/s40618-021-01677-3
(IF = 5,467; MEiN – 100)
<i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i>
I.2. Stępniewska A., Juśkiewicz J., Tutaj K., Fotschiki J., Fotschki B., Ognik K. Effect of chromium picolinate and chromium nanoparticles added to low- or high-fat diets on chromium biodistribution and the blood level of selected minerals in rats. <i>Pol. J. Food Nutr. Sci.</i> 2022, 72, 229-238. DOI: 10.31883/pjfns/151750
(IF = 2,736; MEiN – 100)
<i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i>
I.3. Stępniewska A., Tutaj K., Drażbo A., Kozłowski K., Ognik K., Jankowski J. Estimated intestinal absorption of phosphorus and its deposition in chosen tissues, bones and feathers of chickens receiving chromium picolinate or chromium nanoparticles in diet. <i>PloS One</i> , 2020, 15, e0242820, DOI: 10.1371/journal.pone.0242820
(IF = 3,240; MEiN – 100)
<i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i>
I.4. Ognik K., Drażbo A., Stępniewska A., Kozłowski K., Listos P., Jankowski J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in broiler chicken diet on the performance, redox status and tissue histology. <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> , 2020, 259, 114326, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2019.114326
(IF = 3,247; MEiN – 200)
<i>Brałam udział w opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz napisaniu manuskryptu.</i>
I.5. Stępniewska A., Drażbo A., Kozłowski K., Ognik K., Jankowski J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in the diet of chickens on levels of selected hormones and tissue antioxidant status. <i>Animals</i> , 2020, 10, 45, DOI: 10.3390/ani10010045
(IF = 2,752; MEiN – 100)
<i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i>

Sumaryczny Impact Factor publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR) = 17,422

Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według wykazu czasopism naukowych MEiN = 600

Kopie publikacji wchodzących w skład szczególnego osiągnięcia naukowego stanowią załącznik nr 5. Oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac stanowi załącznik nr 6.

OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Wprowadzenie i uzasadnienie badań

Chrom (Cr) jest pierwiastkiem, którego rola w organizmie nie jest do końca poznana. Z uwagi na jego wpływ na metabolizm węglowodanów, NRC (2005) sklasyfikowało chrom jako pierwiastek niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jednak badania z ostatnich lat wykazały, że efekty korzystne wymagają stosowania wysokich, farmakologicznie odpowiednich dawek, znacznie przekraczających dawki istotne żywieniowo (Vincent, 2013; Di Bona i in., 2011). W związku z tym Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, 2009) dokładnie ocenił niezbędność chromu i doszedł do wniosku, że nie ma jednoznacznych dowodów potwierdzających niezbędność chromu trójwartościowego jako pierwiastka śladowego. Przyjęto klasyfikację chromu jako pierwiastka korzystnego odżywczo lub farmakologicznie (EFSA, 2009).

W przyrodzie Cr występuje głównie w dwóch formach różniących się stopniem utlenienia jako Cr(III) oraz Cr(VI). Rozróżnienie tych dwóch form jest bardzo ważne ze względów toksykologicznych, gdyż Cr(III) jest pierwiastkiem korzystnie oddziałującym na organizm, natomiast Cr(VI) wykazuje działanie toksyczne oraz ma udowodnione działanie kancerogenne. Z tego powodu jako suplement diety zarówno dla zwierząt laboratoryjnych jak i gospodarskich stosowany jest tylko Cr(III). Chrom naturalnie występuje w diecie zwierząt głównie w postaci związków nieorganicznych takich jak np. CrCl_3 , natomiast jako dodatek do diety czy wody stosowane są również formy organiczne tego pierwiastka takie jak kompleksy Cr z kwasem pikolinowym, nikotynowym czy aminokwasami oraz drożdże wzbogacane chromem. Ponadto coraz częściej badane są również nanocząstki Cr jako potencjalny dodatek do diety dla zwierząt.

Wchłanianie Cr z diety jest zazwyczaj niskie i wynosi ok. 1% dla związków nieorganicznych takich jak np. CrCl_3 (Vincent, 2013; Khan i in., 2014), natomiast lepszą absorpcję wykazują kompleksy Cr(III) z ligandami organicznymi (ok. 3%). Natomiast w przypadku nanocząstek Cr, ze względu na ich małe rozmiary i unikatowe właściwości, ciężko stwierdzić czy ich wchłanianie będzie lepsze czy gorsze niż innych form Cr. W dostępnej literaturze można znaleźć niewiele informacji na temat absorpcji nanocząstek Cr w przewodzie pokarmowym zwierząt zarówno laboratoryjnych jak i gospodarskich.

Dokładny mechanizm wnikania tego pierwiastka do komórek (niezależnie od stosowanej formy) nie został dotychczas poznany. Prawdopodobnie przedostaje się on do wnętrza komórki na drodze dyfuzji biernej, pinocytozy lub fagocytozy (Eastmond i in., 2008). Natomiast po wchłonięciu do krwioobiegu, Cr jest transportowany do tkanek poprzez główne białko transportowe żelaza - transferynę. Według Eastmonda i in. (2008) Cr jest szybko usuwany z organizmu głównie z moczem, a jego biologiczny okres półtrwania przy podaniu doustnym wynosi 10 h.

Chrom występujący w ustroju jest związany z oligopeptydem chromoduliną. Jest to niskocząsteczkowa substancja wiążąca Cr (ang. *low molecular weight chromium binding substance* – LMWCr) składająca się z glicyny, cysteiny, asparginianu i glutaminianu z karboksylanami zawierającymi ponad połowę wszystkich reszt aminokwasowych. Chromodulina może związać aż 4 jony Cr^{3+} . Apochromodulina, czyli oligopeptyd bez przyłączonych jonów Cr jest magazynowana w komórkach wrażliwych na insulinę. W odpowiedzi na wzrost stężenia insuliny we krwi, insulina wiąże się ze swoim receptorem, powodując zmianę konformacji, która powoduje autofosforylację reszt tyrozyny po wewnętrznej stronie receptora. Proces ten przekształca receptor w aktywną kinazę tyrozynową i przekazuje sygnał z insuliny do komórki. W odpowiedzi na insulinę Cr jest przenoszony z krwi do komórek wrażliwych na insulinę. Chrom wiąże się z apochromoduliną tworząc holochromodulinę. Następnie holochromodulina wiąże się z receptorem, prawdopodobnie pomagając w utrzymaniu receptora w jego aktywnej konformacji, wzmacniając aktywność kinazy receptora. Gdy sygnalizacja ma być wyłączona, spadek poziomu insuliny we krwi sprzyja rozluźnieniu konformacji receptora, a holochromodulina jest wydalana z komórki do krwi. Następnie chromodulina jest wydalana z organizmu z moczem (Vincent, 2004).

Chrom poprzez aktywację wydzielania insuliny umożliwia prawidłowe przemiany metaboliczne węglowodanów, białek i lipidów. Ponadto badania naukowe potwierdzają wpływ tego pierwiastka na wydzielanie hormonów. Według Inanc i in. (2006) suplementacja

diety chromem skutkuje obniżeniem poziomu „hormonu sytości” – leptyny we krwi. Z kolei badania przeprowadzone na zwierzętach laboratoryjnych pokazują, że Cr zwiększa obwodową dostępność tryptofanu - aminokwasu niezbędnego do syntezy serotoniny (5-HT) (Attenburrow i in., 2002). Natomiast badania przeprowadzone na kurczętach pokazują, że dodatek chromu do diety ptaków utrzymywanych w warunkach stresu cieplnego skutkuje zwiększeniem wydzielania hormonów tarczycy – trijodotyroniny (T3) i tyroksyny (T4) (Sahin i in., 2002). Jednakże często uzyskane wyniki badań są rozbieżne i zależą zarówno od gatunku zwierząt, jak i zastosowanej formy oraz dawki chromu.

Wchłonięty do organizmu chrom poprzez wpływ na wydzielanie hormonów takich jak parathormon (PTH), kortykosteron, insulina czy dopamina może również pośrednio wpływać na gospodarkę mineralną organizmu, a szczególnie na gospodarkę fosforu i wapnia. Fosfor jest składnikiem kwasów nukleinowych i fosfolipidów, bierze udział w zachowaniu równowagi osmotycznej organizmu oraz razem z wapniem uczestniczy w mineralizacji kości. Z uwagi na to, że Cr i Fe mają to samo białko transportowe, Cr może również zaburzać gospodarkę żelaza.

Poprzez wpływ na wydzielanie hormonów i metabolizm węglowodanów chrom również pośrednio wpływa na efekty produkcyjne oraz otluszczenie organizmu. Zarówno producenci jak i konsumenci mięsa drobiowego uważają zmniejszenie otluszczenia tuszek za efekt pożądany. Jednakże wyniki badań przeprowadzonych do tej pory na temat możliwości redukcji otluszczenia poprzez dodatek chromu do diety nie są jednoznaczne zarówno jeżeli chodzi o dawkę czy formę chromu. Według literatury zastosowanie dawek Cr w zakresie 200-3200 µg/kg nie ma wpływu na otluszczenie tuszki (Moeini i in., 2011; Ghanbari i in., 2012, Habibian i in., 2013) lub może skutkować zmniejszeniem otluszczenia (Lien i in., 1999; Sahin i in., 2002, 2003; Kheiri i Toghyani, 2009; Zha i in., 2009; Chen i in., 2018). Według EFSA (2015) suplementacja diety pikolinianem Cr lub drożdżami wzbogacanymi chromem w ilości 0,8 mg/kg diety nie wpływa na efekty produkcyjne kurcząt i indyków. Podobnie Moeini i in. (2011), którzy podawali kurczętom brojlerom w warunkach stresu cieplnego CrCl₃ lub metioninian Cr (Cr-Met) w dawkach 800 i 1200 ppb nie odnotowali wpływu Cr na efekty produkcyjne. Z kolei Sahin i in. (2003), który podawali kurczętom 250 ppb Cr-Pic stwierdzili poprawę wyników produkcyjnych. Zazwyczaj badania naukowe dotyczące stosowania dodatku Cr do diety zwierząt gospodarskich, w tym drobiu nie mają na celu uzyskania poprawy wyników produkcyjnych, a niwelowanie działania stresu cieplnego czy zmniejszenie otluszczenia tuszki. Rozbieżność uzyskanych wyników może być wynikiem wielu czynników, głównie jednak stosowanej dawki i formy Cr. Europejski Urząd ds.

Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) rekomenduje dawkę 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. dla zwierząt laboratoryjnych, nie ma natomiast rekomendacji dla drobiu. Podobnie nie ma rekomendacji National Research Council (NRC, 1994) dla dawek Cr stosowanych u drobiu. Dlatego też w dostępnej literaturze można znaleźć badania dotyczące wpływu na organizm różnych dawek Cr, przykładowo dla pikolinianu chromu badano dawki 200 – 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, natomiast dla nanocząstek Cr 200 – 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Uyanik i in., 2002a, 2002b; Sirirat i in., 2012).

Produkty zawierające Cr w formie CrCl_3 , $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ lub pikolinianu Cr są zatwierdzone jako dodatki do żywności dla ludzi bądź preparaty farmaceutyczne, natomiast nie są obecnie dopuszczone w UE jako dodatki paszowe. Z kolei w USA tripikolinian chromu jest dozwolony jako dodatkowe źródło chromu w diecie świń, przy czym poziom suplementacji jest ograniczony do 200 ppb chromu (van Paemel i in., 2010).

Coraz popularniejsze w badaniach naukowych stają się również nanocząstki chromu ze względu na ich unikalne właściwości. Można przypuszczać że ze względu na ich mały rozmiar, nanocząstki będą lepiej absorbowane w przewodzie pokarmowym niż formy makro. Ponadto nadal niewiele wiadomo na temat działania nanocząstek Cr na organizm, przede wszystkim czy będą miały taki sam wpływ jak makro formy Cr czy też ich mały rozmiar oraz unikatowe właściwości fizyczne wpłyną na ich rolę w organizmie. Interesujące wydaje się również czy wchłonięte nanocząstki zostaną zdeponowane w organizmie i jeżeli tak to jakie skutki będą wywoływały.

Podsumowując, dane literaturowe dostarczają informacji, że chrom ma wpływ na wydzielanie hormonów regulujących gospodarkę węglowodanową. Istnieją dane, z których wynika także związek pomiędzy wydzielaniem ww. hormonów a poziomem składników mineralnych. Dotychczas jednak nie przeprowadzono kompleksowych badań, które dostarczyłyby szerokiej wiedzy na temat wpływu różnych form i dawek chromu na poziom hormonów (innych niż regulujące gospodarkę węglowodanową) oraz składników mineralnych. Wiedza na temat takiego wpływu ma znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne dla hodowców zwierząt gospodarskich. Chrom poprzez wpływ na wydzielanie insuliny może regulować również pośrednio wydzielanie serotoniny. Hormon ten odgrywa modulującą rolę w regulacji temperatury, co jest szczególnie ważne w warunkach stresu cieplnego czy też obniżonej temperatury w hodowli drobiu. Dodatkowo Cr może modulować wydzielanie hormonu związanego ze stresem - noradrenaliny. Zwiększony stres może prowadzić do zahamowania wzrostu zwierząt oraz agresywnych zachowań u ptaków. W hodowli drobiu bardzo ważnym pierwiastkiem jest fosfor, którego deficyty mogą prowadzić

do zwiększonej łamliwości kości. Dodatek Cr do diety kurcząt poprzez wpływ na wydzielanie hormonów może skutkować również zwiększonym wchłanianiem P co byłoby korzystnym efektem stosowania Cr.

Cel i zakres pracy

Postawiono hipotezę, że ilość wydzielanych hormonów (insuliny, glukagonu, leptyny, greliny, serotoniny, dopaminy, noradrenaliny, tyroksyny – T4) oraz ich wpływ na gospodarkę mineralną, status redoks, funkcje wątroby czy otłuszczenie organizmu jest zależna od zastosowanej w diecie formy i dawki chromu a także od ilości tłuszczu w diecie.

Celem badań na zwierzętach laboratoryjnych było porównanie i ustalenie wpływu zastosowania w diecie szczurów dodatku chromu w formie kompleksów organicznych lub nanocząstek na biodystrybucję tego pierwiastka, wydzielanie wybranych hormonów (insuliny, glukagonu, leptyny, greliny, serotoniny, dopaminy, noradrenaliny, tyroksyny – T4) oraz gospodarkę mineralną organizmu.

Celem badań na kurczętach było ustalenie wpływu stosowania różnych form Cr (kompleksów organicznych lub nanocząstek) oraz różnych dawek (3 lub 6 mg/kg) na wydzielanie wybranych hormonów (insuliny, glukagonu, serotoniny, dopaminy, noradrenaliny, tyroksyny – T4), gospodarkę mineralną, status redoks, funkcje wątroby oraz otłuszczenie organizmu.

Omówienie wyników prac wskazanych, jako szczególne osiągnięcie naukowe

W celu weryfikacji hipotezy badawczej przeprowadzono 3 doświadczenia.

Doświadczenie 1 przeprowadzono na 56 szczurach Wistar. Zwierzęta zostały podzielone na 8 grup po 7 szt. w każdej grupie. Doświadczenie prowadzono przez 8 tygodni. Zastosowano dwa typy diety: standardową i wysokotłuszczową oraz 3 formy chromu: pikolinian chromu (Cr-Pic), kompleks chromu z metioniną (Cr-Met) i nanocząstki chromu (Cr-NP). Dawka Cr została wybrana na podstawie zaleceń EFSA (2014) i wynosiła 0,3 mg/kg m.c.

Doświadczenie 2 przeprowadzono na 48 szczurach rasy Wistar karmionych niskotłuszczową (LFD) lub wysokotłuszczową (HFD) dietą z dodatkiem nanocząstek chromu lub pikolinianu chromu. Doświadczenie składało się z dwóch 9 tygodniowych okresów: wstępnego i eksperymentalnego. W początkowym 9-tygodniowym okresie szczury były karmione dietą wysokotłuszczową. Po okresie wstępnym szczury zostały losowo podzielone

na 4 grupy po 12 szt. i karmione przez kolejne 9 tygodni w następujący sposób: grupa LFD-CrPic otrzymywała standardową dietę niskotłuszczową z dodatkiem pikolinianu chromu; grupa LFD-CrNPs - standardową dietę niskotłuszczową z nanocząstkami chromu; grupa HFD-CrPic - dietę wysokotłuszczową z pikolinianem chromu; a grupa HFD-CrNPs - dietę wysokotłuszczową z nanocząstkami chromu. Szczurom podawano chrom w dawce takiej samej jak w doświadczeniu 1 (0,3 mg/kg m.c.).

Doświadczenie 3 przeprowadzono na 405 1-dniowych kurczętach brojlerach Ross 308, które zostały podzielone na 5 grup doświadczalnych (9 powtórzeń x 9 szt.). Grupa kontrolna nie trzymała dodatku Cr do diety, grupy 3 mg/kg Cr-Pic i 6 mg/kg Cr-Pic otrzymywały dodatek pikolinianu chromu odpowiednio w ilości 3 lub 6 mg/kg diety, grupy 3 mg/kg Cr-NP i 6 mg/kg Cr-NP otrzymywały dodatek nanocząstek chromu odpowiednio w ilości 3 lub 6 mg/kg diety. W 35 dniu życia zwierzęta poddano ubojowi i pobrano materiał badawczy.

Szczegółowa charakterystyka metod badawczych wraz z opisem zastosowanych analiz statystycznych otrzymanych wyników, a także szczegółowy opis wyników badań zostały opisane w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe.

Gospodarka węglowodanowa organizmu jest regulowana głównie przez cztery hormony: insulinę, glukagon, grelinę i leptynę. Insulina i glukagon działają przeciwstawnie, podobnie jak grelina i leptyna. Insulina jest produkowana przez komórki β wysp Langerhansa, znajdujące się w trzustce. Hormon ten reguluje metabolizm węglowodanów, tłuszczów i białek, stymulując wychwyt aminokwasów i syntezę białek oraz wykorzystanie glukozy w tkankach (Sahin i in., 2001). Uwolnienie insuliny do krwioobiegu powoduje nasilenie obwodowego zużycia glukozy w wielu narządach, głównie w mięśniach szkieletowych oraz hamuje jej endogenne wytwarzanie w wątrobie. W prezentowanych badaniach odnotowano zwiększenie poziomu insuliny w osoczu krwi szczurów otrzymujących dodatek Cr-Pic oraz brak wpływu stosowania Cr-Met oraz nanocząstek Cr na poziom tego hormonu (**publikacja I.1**). Rola Cr w sekrecji insuliny jest wielotorowa. Według Yildiza i in. (2004) chrom jest kofaktorem aktywności insuliny. Pierwiastek ten wchodzi w skład oligopeptydowej chromoduliny, która wiążąc się z miejscem aktywnym kinazy tyrozynowej receptora insuliny, odgrywa rolę w autoamplifikacji sygnalizacji tego hormonu. Chrom zwiększa wiązanie insuliny z komórkami, liczbę receptorów insulinowych oraz aktywność kinazy receptorów insulinowych (Qiao i in., 2009). Może także aktywować transport GLUT 4 (transporter glukozy) poprzez mechanizm zależny od cholesterolu (Hoffman i in., 2014; Wang i in., 2005). Ponadto Cr zwiększa poziom mRNA receptora insuliny GLUT 4, syntazy glikogenu i

białka UCP3 w komórkach mięśni szkieletowych hodowanych w warunkach in vitro (Qiao i in., 2009). Nowatorskim aspektem zaprezentowanych badań jest stwierdzenie, że spośród przebadanych form chromu jedynie połączenie tego pierwiastka z pikolinianem (w dawce rekomendowanej przez EFSA, 2014) powodowało zwiększenie poziomu insuliny we krwi szczurów.

W badaniach na szczurach stosowano tylko dawki rekomendowane przez EFSA (2014) – 0,3 mg/kg. Z uwagi na brak rekomendacji EFSA (2014) oraz NRC dla stosowania Cr w żywieniu drobiu, w badaniach na kurczętach postanowiono zbadać wpływ większych dawek tego pierwiastka. Zastosowano tylko dwie formy Cr – Cr-Pic oraz Cr-NP, jak również dwie dawki – 3 lub 6 mg/kg diety. Przy zastosowaniu większych dawek niż te rekomendowane dla zwierząt laboratoryjnych odnotowano zwiększenie poziomu insuliny jedynie w osoczu krwi kurcząt otrzymujących 6 mg/kg Cr-NP w stosunku do kurcząt z grupy kontrolnej. Zastosowanie mniejszych dawek Cr-Pic skutkowało zwiększeniem poziomu insuliny u szczurów, natomiast zastosowanie większych dawek tej samej formy Cr u kurcząt nie wpływało na wydzielanie tego hormonu (**publikacja I.5**).

Insulina odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego poziomu glukozy we krwi. W prezentowanych badaniach dodatek Cr do diety kurcząt na poziomie 3 i 6 mg/kg niezależnie od zastosowanej formy zwiększał poziom glukozy we krwi kurcząt. Z kolei badania przeprowadzone przez innych autorów wykazały, że Cr w postaci Cr-Pic podawany w zakresie 200–3200 µg/kg obniżał poziom glukozy we krwi (Lien et al., 1999; Sahin et al., 2002, 2003; Patil i in., 2008). Takie rozbieżności w uzyskiwanych wynikach mogą być spowodowane zastosowaniem różnych form i dawek Cr.

Na metabolizm glukozy mają również wpływ inne hormony - leptyna i grelina. Leptyna jest nazywana potocznie „hormonem sytości”, natomiast grelina „hormonem głodu”. Leptyna zwiększa wrażliwość komórek na działanie insuliny, a przez to również zwiększa zużycie glukozy. Ponadto obniżając poziom neuropeptydu Y, czyli związku pobudzającego łaknienie, leptyna zmniejsza apetyt. W badaniach własnych przy stosowaniu diety wysokotłuszczowej obserwowany jest wysoki poziom leptyny oraz niski poziom greliny w osoczu krwi szczurów (**publikacja I.1**). Organizm, który przez długi czas przyjmuje dietę wysokotłuszczową stopniowo uodparnia się na działanie leptyny, przez co może dojść do zaburzeń wydzielania leptyny i greliny oraz silniejszego i częstszego odczuwania głodu. U szczurów otrzymujących dodatek organicznych form Cr (Cr-Pic lub Cr-Met) odnotowano wyższy poziom leptyny w osoczu krwi niż u szczurów otrzymujących dietę bez dodatku Cr lub z dodatkiem Cr-NP. Orhan i in. (2019), którzy podawali szczurom żywionym dietą

wysokotłuszczową, Cr-Pic i biotynę bądź kompleks Cr z histydyną (Cr-Hist) i biotynę odnotowali zmniejszenie poziomu leptyny w porównaniu do grupy otrzymującej dietę HFD bez dodatku Cr. Odnotowane przez tych autorów wyniki badań mogą być związane z jednoczesnym podawaniem organicznych form Cr oraz biotyny. Również w badaniach przeprowadzonych na ludziach, Inanc i in. (2006) stwierdzili zmniejszenie poziomu leptyny u kobiet z otyłością, które otrzymywały Cr-Pic w dawce 200 µg/dzień przez 8 tygodni.

Z uwagi na udział Cr w procesie wydzielania insuliny, pierwiastek ten może pośrednio wpływać na wydzielanie innych hormonów takich jak serotonina (5-HT), dopamina, noradrenalina, czy histamina. W prezentowanych badaniach (**publikacja I.1**) odnotowano zwiększony poziom serotoniny w osoczu krwi szczurów, które otrzymywały dodatek Cr do diety niezależnie od zastosowanej formy. W badaniach na kurczętach (**publikacja I.5**) również odnotowano podwyższony poziom serotoniny w osoczu krwi kurcząt otrzymujących dodatek Cr do diety, zarówno w postaci Cr-Pic, jak i Cr-NP. Uzyskane wyniki były prawdopodobnie wynikiem zwiększonego poziomu insuliny w osoczu krwi. Insulina wspomaga transport tryptofanu - prekursora serotoniny przez barierę krew-mózg, dzięki swojej zdolności do zwiększania wychwytu aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) przez mięśnie (Komorowski i in., 2012). Z badań Attenburrow i in. (2002) wynika, że Cr-Pic zmniejsza stężenie aminokwasów rozgałęzionych w osoczu, a w konsekwencji zwiększa stosunek tryptofanu do BCAA, przez co pośrednio wpływa na zwiększenie transportu tryptofanu do mózgu. Ponadto u szczurów karmionych dietą suplementowaną Cr-Pic w dawce 100 mg/kg stwierdzono zwiększoną wrażliwość ośrodkowych receptorów serotoninowych 2A (5-HT_{2A}) (Franklin i Odontiadis, 2003). Ze względu na oddziaływanie serotoniny i dopaminy poprzez bezpośrednie połączenia synaptyczne oraz heterokompleksy receptorów 5-HT_{2A} i DA₂ możliwe jest, że chrom również pośrednio wpływa na syntezę dopaminy (Di Giovanni i in., 2008; Van Bockstaele i in., 1994, De Bartolomeis i in., 2013). W prezentowanych badaniach na kurczętach (**publikacja I.5**) odnotowano zwiększenie poziomu dopaminy tylko przy zastosowaniu dawki Cr 3 mg/kg. Zwiększenie poziomu serotoniny i dopaminy w osoczu krwi kurcząt może być również spowodowane zwiększonym poziomem Fe odnotowanym u kurcząt żywionych dietą suplementowaną Cr. Pierwiastek ten jest kofaktorem hydroksylazy tyrozynowej i hydroksylazy tryptofanu enzymów odpowiedzialnych za syntezę serotoniny i dopaminy (Kim i Wessling-Resnick, 2014).

Chrom wpływał również na wydzielania noradrenaliny. Noradrenalina jest jednym z hormonów regulujących proces lipolizy. Odnotowany w prezentowanych badaniach zmniejszony poziom noradrenaliny oraz zwiększone wydzielanie insuliny u szczurów

otrzymujących dodatek Cr-Pic może sugerować inhibicję lipolizy (**publikacja I.1**). Badania na kurczętach również pokazały, że włączenie dodatku Cr do diety niezależnie od zastosowanej dawki i formy skutkowało zmniejszeniem poziomu noradrenaliny (**publikacja I.5**). Z kolei badania Franklin i Odontiadis (2003) wskazują, że dodatek Cr do diety szczurów w dużo większej dawce - 100 mg/kg zwiększał zarówno poziom serotoniny, jak i noradrenaliny.

Poziom glukozy we krwi reguluje nie tylko insulina, ale także układ histaminowy. Wpływ Cr na wydzielanie insuliny może być również przyczyną odnotowanego w prezentowanych badaniach zmniejszonego poziomu histaminy w osoczu krwi szczurów otrzymujących Cr niezależnie od zastosowanej formy (**publikacja I.1**). Zmniejszenie poziomu histaminy odnotowano również w osoczu kurcząt otrzymujących Cr w dawce 3 mg/kg, niezależnie od zastosowanej formy (**publikacja I.5**). Prawdopodobnie Cr, zwiększając poziom insuliny w osoczu, powoduje zmniejszenie stężenia histydyny, która jest prekursorem histaminy. Oprócz bezpośredniego zaangażowania receptorów histaminowych w regulację stężenia glukozy we krwi również aktywacja lub dezaktywacja receptorów histaminowych odgrywa rolę modulującą w regulacji poziomu glukozy we krwi (Masaki i Yoshimatsu, 2007; Sim i in., 2014).

Wyniki zaprezentowanych badań na kurczętach (**publikacja I.5**) wykazały zwiększenie poziomu T4 w osoczu kurcząt otrzymujących Cr-Pic w ilości 6 mg/kg. Również Sahin i in. (2003) odnotowali zwiększony poziom hormonów tarczycy T3 i T4 w osoczu krwi kurcząt żywionych dietą z dodatkiem 0,4 mg/kg Cr-Pic poddanych działaniu stresu cieplnego. Według Sahin i in. (2002) dodatek Cr do diety kurcząt w dawkach 220–1200 µg/kg odchowanych w warunkach stresowych poprawiał wydajność wzrostu poprzez regulację metabolizmu hormonów tarczycy (zwiększone wydzielanie T3 i T4). W dostępnej literaturze brak jest dostatecznej wiedzy na temat wpływu Cr na wydzielanie hormonów tarczycy w standardowych warunkach odchowu, więc uzyskane wyniki trudno odnieść do warunków, jakie towarzyszyły badaniom własnym.

Wpływ Cr na wydzielanie hormonów może być również związany z kumulacją tego pierwiastka w organizmie. W badaniach na szczurach stwierdzono, że dodatek Cr do diety niezależnie od formy skutkowało zwiększeniem spożycia oraz wydalania tego pierwiastka. Z kolei strawność i retencja Cr zależała od zastosowanej formy. U szczurów otrzymujących dodatek organicznych form Cr, czyli Cr-Pic lub Cr-Met odnotowano większą strawność oraz retencję Cr niż u szczurów otrzymujących dodatek Cr-NP (**publikacja I.1**).

W doświadczeniu 2 (**publikacja I.2**) z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych zbadano wpływ dwóch czynników na retencję Cr. Jednym z nich było zastosowanie diety niskotłuszczowej (LFD) lub wysokotłuszczowej (HFD), zaś drugim dodatek Cr-Pic lub Cr-NP do diety. W efekcie odnotowano większe spożycie Cr u szczurów karmionych dietą HFD suplementowaną Cr-NP niż u szczurów karmionych dietą LFD suplementowaną Cr-NP. Powyższe wyniki można częściowo przypisać tworzeniu adduktów złożonych z nanocząstek Cr i wysokiego poziomu nasyconych kwasów tłuszczowych w diecie HFD (Muller i in., 2017). Ponadto niezależnie od rodzaju zastosowanej diety, większe wydalanie Cr z moczem odnotowano u szczurów, otrzymujących Cr w postaci Cr-NP w porównaniu do szczurów otrzymujących Cr w postaci Cr-Pic. Najwyższy % strawności i retencji Cr odnotowano po zastosowaniu diety z LFD-Cr-Pic, natomiast najniższe wartości tych wskaźników odnotowano u szczurów karmionych LFD-Cr-NP. Przy zastosowaniu diety HFD zastosowana forma Cr nie miała wpływu na % strawności i retencji Cr. Pikolinian Cr wykazuje właściwości hydrofobowe, przez co jest łatwo wchłaniany z przewodu pokarmowego w porównaniu z innymi formami Cr, takimi jak nikotynian czy chlorki (Di Silvestro i Dy, 2007). Kottwitz i in. (2009) odnotowali, że wchłanianie Cr podawanego w formie Cr-Pic jest dwa razy większe niż Cr w formie CrCl_3 . Lamson i Plaza (2002) stwierdzili względną stabilność Cr-Pic w ludzkim soku żołądkowym przez ok. trzy godziny, wymagającą wysokiego stężenia kwasu (0,1 M) do rozerwania wiązań między Cr a kwasem pikolinowym. Jednakże tylko niewielka porcja wchłoniętego Cr-Pic jest metabolizowana w wątrobie do fizjologicznej formy Cr i magazynowana w organizmie. Większość wchłoniętego Cr-Pic jest transportowana do nerek i wydalana z moczem. Według Lien i in. (2009) wysoki i porównywalny % strawności wykazuje Cr-Pic zarówno w formie makro jak i nanocząstek. W prezentowanych badaniach większą strawność wykazywał Cr w formach organicznych niż w formie nanocząstek co może być spowodowane mniejszym wydalaniem tego pierwiastka z kałem i większą jego pulą w organizmie. W literaturze można znaleźć dużo badań na temat porównania wchłaniania oraz retencji Cr podawanego w postaci związków nieorganicznych i organicznych. Brakuje natomiast informacji na temat porównania jelitowego wchłaniania nanocząstek chromu i form organicznych tego pierwiastka.

Podawanie zwierzętom Cr może skutkować kumulacją tego pierwiastka w tkankach. Z badań własnych przeprowadzonych na szczurach wynika, że zastosowanie diety HFD lub LFD z dodatkiem Cr w postaci Cr-NP lub Cr-Pic, nie wpływało na kumulację Cr w mózgu, śledzionie, nerkach, wątrobie, kościach i mięśniach szczurów (**publikacja I.2**). Zastosowanie w badaniach na kurczętach większych dawek Cr tj. 3 lub 6 mg/kg (**publikacja I.3**)

skutkowało zwiększoną kumulacją tego pierwiastka w jelicie cienkim, wątrobie, skórze, kościach i piórach. Według Lindemann i in. (2008) niektóre tkanki takie jak np. kości kumulują Cr przez długi czas, natomiast tkanki takie jak np. serce, mózg czy trzustka relatywnie krótko. Dodatek do diety kurcząt Cr-NP niezależnie od zastosowanej dawki lub 6 mg/kg Cr-Pic skutkowało zwiększeniem kumulacji tego pierwiastka w wątrobie o 12,5 - 30% w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei tylko zastosowanie 6 mg/kg Cr-NP spowodowało zwiększenie poziomu Cr w mięśniu piersiowym kurcząt o ok. 30% w stosunku do grupy kontrolnej.

Ciekawą zależność zaobserwowano w przypadku kości. Zastosowanie Cr-Pic skutkowało zwiększoną kumulacją Cr w tej tkance o ok. 70% przy zastosowaniu dawki 3mg/kg i aż o 210% przy zastosowaniu dawki 6 mg/kg. Z kolei zastosowanie Cr-NP nie skutkowało zwiększeniem kumulacji tego pierwiastka w kościach w stosunku do grupy kontrolnej. Ustalono zatem, że nie tylko dawka, ale również forma Cr wpływa na kumulację tego pierwiastka w kościach. Podobną zależność odnotowano w przypadku piór. Z kolei Sathyabama i in. (2016) prowadząc badania na nioskach stwierdzili, że forma chromu (Cr-Pic czy Cr-NP) nie ma wpływu na kumulację tego pierwiastka w tkankach, a proces ten determinowany jest wyłącznie przez zastosowaną dawkę Cr.

Kumulacja Cr w kościach nie jest zjawiskiem pożądanym bowiem może wpływać na metabolizm fosforu. Według Sankaramanivela i in. (2006) fosfor nie jest uwalniany z kości, natomiast gdy poziom tego pierwiastka jest obniżony w komórkach, bardziej prawdopodobne jest zwiększenie wchłaniania jelitowego P lub zmniejszenie jego wydalania z moczem. Prezentowane badania wskazują jednak, że resorpcja P z kości była bardzo wysoka (około 30%) po zastosowaniu Cr-NP (3 i 6 mg/kg) oraz Cr-Pic w dawce 6 mg/kg w porównaniu z kontrolą. Uzyskane wyniki wskazują na ryzyko stosowania Cr w diecie kurcząt z uwagi na potencjalnie większą łamliwość kości. Badania z ostatnich lat wykazały, że na mineralizację kości wpływa również stres oksydacyjny, gdyż reaktywne formy tlenu biorą udział w resorpcji Ca i P z kości (Soudani i in., 2011, Yang i in., 2001; Sontakke i Tare, 2002). Z prezentowanych badań (**publikacja I.5**) wynika, że Cr może mieć działanie prooksydacyjne w wątrobie i mięśniu piersiowym, a zatem obniżenie poziomu P w kościach może być również związane ze stresem oksydacyjnym generowanym przez Cr.

Pomimo tego, iż w obrazie histologicznym jelita kurcząt otrzymujących dodatek Cr do diety (**publikacja I.4**) stwierdzono uszkodzenia kosmków to badania ex vivo wykonane metodą worka jelitowego wykazały, że stosowanie Cr w diecie kurcząt w różnych formach i dawkach nie wpływa na wchłanianie jelitowe P (**publikacja I.3**). Uzyskane wyniki można

prawdopodobnie wytłumaczyć faktem, że Cr i P mają różne ładunki jonowe i dlatego mogą być wchłaniane do enterocytów różnymi kanałami oraz mogą wykazywać zróżnicowane powinowactwo do białek transportowych. Niemniej jednak Cr wchłonięty do organizmu może pośrednio wpływać na poziom P w osoczu i jego odkładanie w innych tkankach.

Z badań przeprowadzonych na szczurach (**publikacja I.1**) wynika, że Cr dodawany do diety w formie Cr-Pic lub Cr-NP skutkował obniżeniem poziomu P w osoczu krwi szczurów. Z kolei wraz ze wzrostem poziomu Cr w diecie kurcząt, niezależnie od zastosowanej formy, poziom P wzrastał w osoczu krwi (**publikacja I.3**). Wpływ Cr na wchłanianie P może zależeć od stosowanej dawki (szczury otrzymywały znacznie niższe dawki Cr) lub wieku zwierząt (młode kurczęta mają niedojrzały nabłonek jelitowy w porównaniu do ptaków 35-dniowych). Ponadto poziom P w osoczu krwi jest zależny od pory uboju i zmienia się w ciągu dnia wraz z upływem czasu od ostatniego karmienia. Wchłanianie jelitowe i akumulacja fosforanów w tkankach jest również regulowane przez hormony, nie tylko przez parathormon (PTH), ale również przez hormony, których wydzielanie jest modulowane przez Cr, czyli insulinę i dopaminę (Levi i in., 2019).

Dodatek Cr do diety może mieć również wpływ na poziom innych pierwiastków w osoczu krwi. Badania innych autorów dotyczące wpływu dodatku do diety Cr na poziom składników mineralnych we krwi wykazały istotną interakcję pomiędzy Cr a Fe (Anderson i in., 1996; Lindemann i in., 2008; Yoshida i in., 2010). Ponadto suplementacja diety Cr(III) skutkowała zwiększeniem poziomu Zn i zmniejszeniem poziomu Cu (Vlizlo i in., 2014). W prezentowanych badaniach (**publikacja I.2**) odnotowano zwiększony poziom Zn, Cu i P w osoczu krwi szczurów otrzymujących dietę LFD z dodatkiem Cr-Pic w porównaniu do szczurów otrzymujących dietę HFD z dodatkiem Cr-Pic. Takich różnic nie odnotowano natomiast przy stosowaniu dodatku Cr-NP. Najniższe stężenie Fe w osoczu krwi szczurów odnotowano w grupie trzymującej dietę HFD z dodatkiem Cr-NP w porównaniu do wszystkich pozostałych grup eksperymentalnych. Obniżenie poziomu Fe może być spowodowane zablokowaniem transferyny przez Cr.

Podawanie Cr kurczętom skutkowało kumulacją tego pierwiastka w wątrobie co może prowadzić do zaburzeń metabolizmu, intensyfikacji reakcji oksydacyjnych oraz zmian morfologicznych tego organu. Stwierdzono, że dodatek Cr do diety kurcząt zarówno w dawce 3 jak i 6 mg/kg, niezależnie od stosowanej formy, zwiększał poziom MDA w wątrobie, ale tylko zastosowanie wyższej dawki Cr, tj. 6 mg/kg skutkowało zwiększonym poziomem LOOH. Odnotowane zwiększenie tych parametrów świadczy o intensywniejszej peroksydacji lipidów w wątrobie kurcząt otrzymujących dodatek Cr do diety. Nasilenie procesów

oksydacyjnych w wątrobie prowadziło do niekorzystnych zmian w obrazie histologicznym tego organu oraz zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych (obniżona aktywność SOD oraz wyższa aktywność CAT) (**publikacja I.5**). Ponadto dodatek Cr w ilości 3 lub 6 mg/kg, zarówno w postaci Cr-Pic, jak i Cr-NP, skutkowało zwiększeniem aktywności AST i ALP oraz zmniejszeniem aktywności ALT i LDH w osoczu krwi kurcząt (**publikacja I.4**). Znaczący wzrost aktywności transaminazy AST może być spowodowany wyciekaniem enzymów przez uszkodzone błony komórkowe i/lub zwiększoną syntezą enzymów przez wątrobę. Jest to niekorzystny efekt stosowania Cr już w dawce 3 mg/kg jako dodatku do diety kurcząt.

Przeprowadzone badania wykazały nasilenie procesów oksydacyjnych w wątrobie pod wpływem stosowania Cr w postaci nanocząstek. W grupach otrzymujących dodatek 3 lub 6 mg/kg Cr-NP zaobserwowano znaczne przekrwienie tkanki wątroby z licznymi naciekami komórek jednojądrzastych oraz rozległe ogniska zwyrodnienia tłuszczowego (**publikacja I.4**). Podobne wyniki uzyskali Fan i in. (2015), którzy podawali kurczętom CrCl_3 przez 42 dni w dużo wyższych dawkach od 0,625 (12,5% LD50) do 2,5 g/kg m.c. (50% LD50). Odnotowali oni niekorzystne zmiany w obrazie histologicznym w wątrobie kurcząt otrzymujących dodatek Cr do diety jak również zwiększenie poziomu MDA i zmniejszenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Prezentowane badania wskazują, że już dużo niższe dawki Cr niż te stosowane przez Fan i in. (2015), skutkowały zmianami w obrazie histologicznym wątroby kurcząt.

W prezentowanych badaniach odnotowano spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) również w osoczu krwi kurcząt, którym podawano dietę suplementowaną chromem (**publikacja I.4**). Uzyskane wyniki mogą być spowodowane obniżeniem poziomu Cu i Zn w osoczu krwi kurcząt, które otrzymywały dodatek Cr do diety, gdyż pierwiastki te są kofaktorami dysmutazy ponadtlenkowej (**publikacja I.5**).

Poza wpływem na wydzielanie hormonów oraz gospodarkę mineralną, dodatek Cr do diety na poziomie 3 i 6 mg/kg powodował zmniejszenie ilości tłuszczu brzuszno kurcząt w stosunku do grupy kontrolnej. Niektóre doniesienia literaturowe (Diaz i in., 2008; Wang i in., 2007) sugerują, że Cr może hamować apetyt i stymulować termogenezę poprzez uwrażliwienie wrażliwych na insulinę glukoreceptorów w mózgu. Ponadto rozmieszczenie tkanki tłuszczowej w organizmie jest związane z wrażliwością na insulinę; tłuszcz obwodowy jest bardziej wrażliwy na insulinę niż tłuszcz centralny znajdujący się w klatce piersiowej i brzuchu (Yazaki i in., 2010).

W prezentowanych badaniach (**publikacja I.4**) dodatek Cr do diety kurcząt w postaci zarówno Cr-Pic jak i Cr-NP niekorzystnie wpływał na wydajność wzrostu. Kurczęta

otrzymujące dodatek Cr do diety miały niższą końcową masę ciała i wyższe dzienne spożycie paszy. Z kolei Youssef i in. (2022), którzy podawali kurczętom dodatek Cr w postaci kompleksu z metioniną w mniejszej ilości tj. 200 – 400 ppb odnotowali poprawę wyników produkcyjnych. Zastosowane w prezentowanych badaniach dawki Cr okazały się być na duże.

Podsumowanie i wnioski

Osiągnięciem naukowym z przeprowadzonych badań na zwierzętach laboratoryjnych i zwierzętach gospodarskich (kurczęta) jest ustalenie wpływu oddziaływania różnych form chromu na gospodarkę wybranych hormonów, a w szczególności serotoniny, histaminy, noradrenaliny, dopaminy, insuliny, greliny i leptyny. Uzyskane wyniki badań są nowatorskie, bowiem dotychczas badacze skupiali się głównie na ustaleniu wpływu oddziaływania chromu (szczególnie jego formy organicznej: Cr-pikolinian) na hormony regulujące gospodarkę węglowodanową.

Osiągnięciem naukowym jest ustalenie, że stosowanie w diecie szczurów rekomendowanej przez EFSA dawki chromu w formie pikolinianu – 0,3 mg/kg m.c. wprawdzie potwierdza korzystny wpływ na gospodarkę węglowodanową, jednak nowatorskim aspektem przeprowadzonych badań jest ustalenie, że dodatkowo korzystnie oddziałuje na inne ważne hormony tj. serotoninę, histaminę czy noradrenalinę. Uzyskane nowatorskie wyniki badań odnośnie w/w hormonów wskazują, że dodatek chromu w formie pikolinianu może stanowić dodatek paszowy dla zwierząt gospodarskich stosowany w celu łagodzenia reakcji na stres. W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych ustalono również, że poprzez stosowanie innych form chromu m.in. nanocząstek tego pierwiastka lub chromu w kompleksie z metioniną można uzyskać korzystny efekt oddziaływania tych form na poziom serotoniny i histaminy, jednakże te formy pierwiastka nie wpływają na regulację hormonów gospodarki węglowodanowej (publikacja I.1). Z punktu widzenia stosowania dodatku chromu w dietach dla zwierząt gospodarskich ten aspekt jest bardzo istotny, bowiem oddziaływanie chromu na gospodarkę węglowodanową ma istotny związek z oczekiwaną np. redukcją otluszczenia tuszki drobiowej. W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych ustalono także, że stosowanie dodatku chromu w formie pikolinianu do diety (szczególnie wysokotłuszczowej) może niekorzystnie obniżyć poziom fosforu, co jest istotnie niekorzystne w hodowli drobiu (publikacja I.2).

Jako osiągnięcie naukowe z badań nad chromem kontynuowanych na kurczętach brojlerach można wskazać, iż potwierdzono korzystne oddziaływanie dodatku do diety tego

pierwiastka w formie pikolinianu i nanocząstek w dawce 3 i 6 mg/kg na poziom hormonów tj. serotoniny czy noradrenaliny, jednakże chociaż zastosowane dawki badanych form chromu korzystnie oddziałują na w/w hormony, oraz że po ich stosowaniu można uzyskać oczekiwany efekt zmniejszenia otłuszczenia tuszki, to sposób oddziaływania na hormony regulujące gospodarkę węglowodanową okazał się odmienny (publikacja I.5). Przeprowadzone badania na kurczętach poszerzone o ocenę wyników odchowu, analizę statusu oksydoredukcyjnego, wskaźników metabolizmu, histologię wątroby, trzustki i jelita cienkiego pozwoliły na jednoznaczne stwierdzenie, że dodatek chromu w dawce 3 mg/kg do diety kurcząt, niezależnie od zastosowanej formy nie powinien być rekomendowany z uwagi na fakt, że powoduje niekorzystne zmiany w statusie oksydoredukcyjnym i obrazie histologicznym tkanek ptaków (publikacja I.4). Dodatkowo kolejnym argumentem wskazującym, że stosowanie chromu w dawce 3 mg/kg nie powinno być rekomendowane jest oddziaływanie tego pierwiastka na obniżenie poziomu fosforu w kościach kurcząt (publikacja I.4). Potencjalne zastosowanie chromu w dietach kurcząt powinno uwzględniać dawki niższe niż 3 mg/kg diety.

Bibliografia

1. Anderson R.A., Bryden N.A., Polansky M.M., Gautschi, K. Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *J. Trace Elem. Experimen. Med.* **1996**, 9, 11–25.
2. Attenburrow M.J., Odontiadis J., Murray B.J., Cowen P.J., Franklin M. Chromium treatment decreases the sensitivity of 5-HT_{2A} receptors. *Psychopharmacology* **2002**, 4, 432–436.
3. Chen G., Gao Z., Chu W., Cao Z., Li C., Zhao H. Effect of chromium picolinate on fat deposition, activity and genetic expression of lipid metabolism-related enzymes in 21 day old Ross broilers. *Asian-australas J Anim. Sci.* **2018**, 31, 569.
4. De Bartolomeis A., Buonaguro E.F., Iasevoli F. Serotonin-glutamate and serotonin-dopamine reciprocal interactions as putative molecular targets for novel antipsychotic treatments: from receptor heterodimers to postsynaptic scaffolding and effector proteins. *Psychopharmacology* **2013**, 1, 1–19.
5. Di Bona K.R., Love S., Rhodes N.R., McAdory D., Sinha S.H., Kern N., Kent J., Strickland J., Wilson A., Beaird J., Ramage J., Rasco J.F., Vincent J.B. Chromium is not an essential element for mammals: effects of a “low-chromium” diet. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, 16, 381–390.
6. Di Giovanni G., Di Matteo V., Pierucci M., Esposito E. Serotonin-dopamine interaction electrophysiological evidence. *Prog. Brain Res.* **2008**, 172, 45–71.
7. Di Silvestro R.A., Dy E. Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2007**, 21, 120–124.

8. Diaz M. L., Watkins B. A., Li Y., Anderson R. A., Campbell W. W. Chromium picolinate and conjugated linoleic acid do not synergistically influence diet and exercise-induced changes in body composition and health indexes in overweight women. *J Nutr Biochem* **2008**, 19, 61–68.
9. Eastmond D. A., MacGregor J. T., Slesinski R. S. Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Crit. Rev. Tox.* **2008**, 38, 173-190.
10. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on a request from the European Commission on the safety and efficacy of chromium methionine (Availa® Cr) as feed additive for all species. *EFSA J.* **2009**, 1043, 1–69.
11. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA J* **2014**, 12, 3845.
12. Fan W.T., Zhao X.N., Cheng J., Liu Y.H., Liu J.Z. Oxidative stress and hepatocellular injury induced by oral administration of Cr³⁺ in chicken. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2015, 29, 280–287.
13. Franklin M., Odontiadis J. Effects of treatment with chromium picolinate on peripheral amino acid availability and brain monoamine function in the rat. *Pharmacopsychol.* **2003**, 36, 176–180.
14. Ghanbari S., Ebrahimmazhad Y., Eshratkhah B., Nazeradi K. Effect of dietary chromium supplementation on performance and carcass traits of broiler chicks. *Pak. J. Nutr.* **2012**, 11, 467-472.
15. Habibian M., Ghazi S., Moeini M.M. Lack of effect of dietary chromium supplementation on growth performance and serum insulin, glucose, and lipoprotein levels in broilers reared under heat stress condition. *Biol Trace Elem Res* **2013**, 153, 205–211.
16. Hoffman N.J., Penque B.A., Habegger K.M., Sealls W., Tackett L., Elmendorf J.S. Chromium enhances insulin responsiveness via AMPK. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, 25, 565–572.
17. Inanç N., Uyanik F., Sahin H., Yaman H., Erdem O. Effects of chromium supplementation on body composition, leptin, ghrelin levels and selected biochemical parameters in obese women. *Trace Elem. Electrol.* **2006**, 23, 128–133.
18. Khan R.U., Naz S., Dhama K., Saminathan M., Tiwari R., Jeon G.J., Laudadio V., Tufarelli, V. Modes of action and beneficial application of chromium in poultry nutrition, production and health: a review. *Int. J. Pharm.* **2014**, 10, 357-367.
19. Kheiri F., Toghyani M. Effect of different levels of inorganic chromium on performance and immunity of broiler chicks. *J. Anim. Vet. Adv.* **2009**, 8, 1819-1823.
20. Kim J., Wessling-Resnick M. Iron and Mechanisms of Emotional Behavior. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, 25, 1101–1107.
21. Komorowski J. R., Tuzcu M., Sahin N., Juturu V., Orhan C., Ulas M., Sahin K. Chromium picolinate modulates serotonergic properties and carbohydrate metabolism in a rat model of diabetes. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, 149, 50–56.
22. Kottwitz K., Laschinsky N., Fischer R., Nielsen P. Absorption, excretion and retention of ⁵¹Cr from labelled Cr-(III)-picolinate in rats. *Biometals* **2009**, 22, 289–295.
23. Lamson D.W., Plaza S.M. The safety and efficacy of high-dose chromium. *Alter. Med. Rev.* **2002**, 7, 218–235.

24. Levi M., Gratton E., Forster I.C., Hernando N., Wagner C.A., Biber J., Sorribas V., Murer H. Mechanisms of phosphate transport. *Nature Rev. Nephrol.* **2019**, 15, 482-500.
25. Lien T.F., Horng Y.M., Yang K.H., Performance, serum characteristics, carcass traits and lipid metabolism of broilers as affected by supplement of chromium picolinate. *Brit. Poult. Sci.* **1999**, 40, 357-363.
26. Lien T.F., Yeh H.S., Lu F.Y., Fu C.M. Nanoparticles of chromium picolinate enhance chromium digestibility and absorption. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, 89, 1164–1167.
27. Lindemann M.D., Cromwell G.L., Monegue H.J., Purser K.W. Effect of chromium source on tissue concentration of chromium in pigs. *J. Anim. Sci.* **2008**, 86, 2971–2978.
28. Masaki T., Yoshimatsu H. Neuronal histamine and its receptors in obesity and diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* **2007**, 3, 212–216.
29. 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, 715–724.
30. Muller L., Baldwin K., Barbacci D.C., Jackson S.N., Roux A., Balaban C.D., Brinson B.E., McCully M.I., Lewis E.K., Schultz J.A. Woods A.S. Laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of endogenous lipids from rat brain tissue implanted with silver nanoparticles. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, 28, 1716–1728.
31. National Research Council (NRC), Nutrient Requirements of Poultry, edn 9th rev. **1994**. National Academy Press, Washington, D. C., USA.
32. NRC (National Research Council of the National Academies). Mineral Tolerance of Animals, 2nd Revised Edition. **2005**. The National Academies Press, Washington D.C., USA.
33. Orhan C., Kucuk O., Tuzcu M., Sahin N., Komorowski J.R., Sahin K. Effect of supplementing chromium histidinate and picolinate complexes along with biotin on insulin sensitivity and related metabolic indices in rats fed a high-fat diet. *Food Sci. Nutr.* **2019**, 7, 183–194.
34. Patil A., Palod J., Singh V.S., Kumar A. Effect of graded levels of chromium supplementation on certain serum biochemical parameters in broilers. *Ind. J. Anim. Sci.* **2008**, 78, 1149–1152.
35. Qiao W., Peng Z., Wang Z., Wei J., Zhou A. Chromium improves glucose uptake and metabolism through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2009**, 131, 133-142.
36. Sahin K., Sahin N., Kucuk O. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high environmental temperature (32 °C). *Nutr. Res.* **2003**, 23, 225–238.
37. 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, 53-64.
38. Sahin, K.; Kucuk, O.; Sahin, N.; Ozbey, O. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on egg production, egg quality and serum concentrations of insulin, corticosterone, and some metabolites of Japanese quails. *Nutr. Res.* **2001**, 21, 1315–1321.
39. Sankaramanivel S., Jeyapriya R., Hemalatha D., Djody S., Arunakaran J., Srinivasan N. Effect of chromium on vertebrae, femur and calvaria of adult male rats. *Human Exp Toxicol.* **2006**, 25, 311–318.

40. Sathyabama T., Jagadeeswaran A. Effect of chromium supplementation on performance, mineral retention and tissue mineral accumulation in layer chickens. *J Anim Res.* **2016**, 6, 989–994.
41. Sim Y.B., Park S.H., Kim S.S., Kim C.H., Kim S.J., Lim S.M., Jung J.S., Ryu O.H., Choi M.G., Suh H.W. The modulatory role of spinally located histamine receptors in the regulation of the blood glucose level in d-glucose-fed mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **2014**, 18, 41–46.
42. Sirirat N., Lu J., Hung A.T., Chen S., Lien T. Effects different levels of nanoparticles chromium picolinate supplementation on growth performance, mineral retention, and immune responses in broiler chickens. *J. Agric. Sci.* **2012**, 4, 48-58.
43. Sontakke A.N., Tare R.S. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect bone metabolism. *Clin Chim Acta.* **2002**, 3, 145–148.
44. Soudani N., Amara I.B., Troudi A., Bouaziz H., Boudawara T., Najiba Zegha N. Oxidative stress induced by chromium (VI) in bone of suckling rats. *Toxicol Industr Health.* **2011**, 27, 724–734.
45. Uyanik F., Atasever A., Ozdamar S., Aydin F. Effects of dietary chromium chloride supplementation on performance, some serum parameters, and immune response in broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* **2002a**, 90, 99-115.
46. Uyanik F., Kaya S., Kolsuz A.H., Eren M., Sahin N. The effects of chromium supplementation on egg production, egg quality, and serum parameters in laying hens. *Taurk. J. Vet. Anim. Sci.* **2002b**, 26, 379- 387.
47. Van Bockstaele E.J., Cestari D.M., Pickel V.M. Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Res.* **1994**, 2, 307–322.
48. Van Paemel M., Dierick N., Janssens G., Fievez V., De Smet S. Selected trace and ultratrace elements: Biological role, content in feed and requirements in animal nutrition – Elements for risk assessment. EFSA Supporting Publication **2010**, 7:EN-68, 1132.
49. Vincent J. B. Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society*, **2004**, 63, 41-47.
50. Vincent J.B. The bioinorganic chemistry of chromium. Wiley **2013**, Chichester, UK
51. Vlizlo V., Iskra R., Maksymovych I., Lis M.W., Niedziółka J.W. Disturbance of antioxidant protection and natural resistance factors in rats with different availabilities of trivalent chromium. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **2014**, 38, 138–144.
52. Wang H., Kruszewski A., Brautigam D.L. Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase. *Biochem.* **2005**, 44, 8167–8175.
53. Wang Z.Q., Qin J., Martin J., Zhang X.H., Sereda O., Anderson R.A., Pinsonat P., Cefalu W.T. Phenotype of subjects with type 2 diabetes mellitus may determine clinical response to chromium supplementation. *Metabolism* **2007**, 56, 1652–1655.
54. Yang S., Madyastha P., Bingel S., Ries W., Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem.* **2001**, 276, 5452–5458.
55. Yazaki Y., Faridi Z., Ma Y., Ali A., Northrup V., Njike V.Y., Liberti L., Katz D.L. A pilot study of chromium picolinate for weight loss. *J. Altern. Complement. Med.* **2010**, 16, 291–299.
56. Yildiz, A.Ö.; Parlat, S.S.; Yazgan, O. The effects of organic chromium supplementation on production traits and some serum parameters of laying quails. *Rev. Méd. Vét.* **2004**, 155, 642–646.

57. Yoshida M., Hatakeyama E., Hosomi R., Kanda S., Nishiyama T., Fukunaga K. Tissue accumulation and urinary excretion of chromium in rats fed diets containing graded levels of chromium chloride or chromium picolinate. *J. Toxicol. Sci.* **2010**, 35, 485–491.
58. Youssef I. M., Abdo I. M., Elsukkary H. F., El-Kady M. F., Elsayed, M. Effects of dietary supplementation of chromium methionine chelate on growth performance, oxidative stress, hematological indices, and carcass traits of broiler chickens. *Trop. Anim. Health Prod.* **2022**, 54, 267.
59. Zha L.Y., Zeng J.W., Chu X.W., Mao L.M., Luo H.J. Efficacy of trivalent chromium on growth performance, carcass characteristics and tissue chromium in heat-stressed broiler chicks. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, 89, 1782-1786.

V. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłam staż naukowy w Faculty of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences Veterinary Academy w Kownie (28.06.2019 – 29.09.2019 r.). W czasie stażu zdobyłam praktyczną wiedzę z zakresu prowadzenia badań na zwierzętach oraz umiejętności wdrażania nowych metod badawczych z zakresu toksykologii związków, fizjologii, anatomii patologicznej i farmakologii. W ramach programu Erasmus+ odbyłam 3 wizyty w Lithuanian University of Health Sciences. Celem pierwszej wizyty była wymiana doświadczeń w prowadzeniu badań naukowych na zwierzętach oraz nawiązanie współpracy międzynarodowej pomiędzy Katedrami. W trakcie pozostałych dwóch wyjazdów odbyłam zajęcia ze studentami na temat wpływu endokrynnego oddziaływania chromu, zwłaszcza w przypadku stosowania diety wysokotłuszczowej. Przeprowadzone zostały również zajęcia laboratoryjne ze studentami, których celem było praktyczne pokazanie metod oznaczania hormonów za pomocą testów immunoenzymatycznych.

VI. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.

Na mój dorobek dydaktyczny składa się realizacja zajęć z 27 przedmiotów prowadzonych na Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Biologii Środowiskowej oraz Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie na kierunkach: Biokosmetologia, Kryminalistyka w biogospodarce, Ochrona Środowiska, Biologia, Zootechnika, Biologia

Sądowa, Bezpieczeństwo i higiena pracy, Dietetyka, Biologia, specjalność nauczanie biologii i chemii, Aktywność fizyczna i agroturystyka kwalifikowana, Bezpieczeństwo i certyfikacja żywności, Biobezpieczeństwo i zarządzanie kryzysowe oraz zajęć w ramach 2 kierunków studiów podyplomowych (Analityka laboratoryjna w ochronie środowiska oraz Analityka, Bezpieczeństwo i Certyfikacja Żywności). Zestawienie realizowanych kursów dydaktycznych zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz prowadzonych zajęć dydaktycznych

Lp.	Przedmiot	Kierunek	Forma zajęć	Rok/ stopień
1.	Chemia kosmetyczna	Biokosmetologia	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
2.	Chemia ogólna i analityczna	Kryminalistyka w biogospodarce	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
3.	Substancje zapachowe w biokosmetykach	Biokosmetologia	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	II/°II
4.	Biochemia	Biokosmetologia	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
5.	Toksykologia	Biokosmetologia	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	II/°I
6.	Podstawy analityki w ochronie środowiska	Ochrona środowiska	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
7.	Ekotoksykologia	Ochrona środowiska	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	II/°II
8.	Bioanalityka	Ochrona środowiska	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°II
9.	Analiza i ocena zagrożeń	Bezpieczeństwo i higiena pracy	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
10.	Ksenobiotyki w środowisku pracy	Bezpieczeństwo i higiena pracy	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
11.	Problemy toksykologiczne w środowisku pracy	Bezpieczeństwo i higiena pracy	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°II
12.	Toksykologia	Biologia	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°II
13.	Analiza chromatograficzna	Biologia	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°II
14.	Toksykologia	Biologia sądowa	ćwiczenia	I/°II

	sądowa		laboratoryjne/audytoryjne	
15.	Chemia sądowa	Biologia sądowa	Wykład/ćwiczenia audytoryjne	I/°II
16.	Toksykologia	Dietetyka	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
17.	Chemia analityczna	Biologia, specjalność nauczanie biologii i chemii	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
18.	Biochemia z elementami biochemii wysiłku	Aktywność fizyczna i agroturystyka kwalifikowana	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
19.	Analityka laboratoryjna	Zootechnika	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
20.	Chemia toksykologiczna	Biologia, specjalność nauczanie biologii i chemii	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
21.	Toksykologia żywności	Bezpieczeństwo i certyfikacja żywności	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	III/°I
22.	Certyfikacja laboratorium	Biobezpieczeństwo i zarządzanie kryzysowe	Wykład/ćwiczenia laboratoryjne	III/°I
23.	Analiza toksykologiczna żywności	Analityka, Bezpieczeństwo i Certyfikacja Żywności	ćwiczenia laboratoryjne	Studia Podyplom owe
24.	Aspekty zdrowotne i nadzór nad jakością żywności	Analityka, Bezpieczeństwo i Certyfikacja Żywności	ćwiczenia audytoryjne	Studia Podyplom owe
25.	Analityka toksykologiczna żywności	Analityka Laboratoryjna w Ochronie Środowiska	ćwiczenia laboratoryjne	Studia Podyplom owe
26.	Metrologia chemiczna z elementami akredytacji laboratorium	Analityka Laboratoryjna w Ochronie Środowiska	Wykład/ćwiczenia audytoryjne	Studia Podyplom owe
27.	Analityka	Analityka	ćwiczenia laboratoryjne	Studia

Laboratoryjna w Ochronie Środowiska	Laboratoryjna w Ochronie Środowiska	Podyplomowe
-------------------------------------	-------------------------------------	-------------

Pod moją opieką naukową zrealizowanych zostało 29 prac magisterskich, 14 prac inżynierskich oraz 3 prace licencjackie. Byłam również promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej dr Roberta Chachaja obronionej w 2020 roku.

W ramach poszerzania swojej wiedzy i umiejętności dydaktycznych uczestniczyłam w projekcie realizowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Mistrzowie Dydaktyki”. W ramach projektu odbyłam szkolenie prowadzone przez Ghent University w Gandawie (Belgia, 02-06.12.2019) oraz prowadziłam zajęcia ze studentami metodami tutoringu.

Do głównych aspektów mojej działalności organizacyjnej można zaliczyć: członkostwo w Kolegium Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki w latach 2019-2021; członkostwo w Komisji ds. Organizacji i Rozwoju Wydziału; członkostwo w Radach Programowych kierunków studiów Biokosmetologia, Bezpieczeństwo i Higiena Pracy, oraz Animal Science and Dairy Production. Byłam opiekunem roku studentów kierunków Bezpieczeństwo i Higiena Pracy, Ochrona Środowiska oraz Biokosmetologia.

W ramach popularyzacji nauki organizowałam projekty w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki, warsztaty dla uczniów szkół średnich oraz dni otwarte uniwersytetu. Działania mające na celu popularyzację nauki zostały zestawione w tabeli 2.

Tabela 2. Działalność na rzecz promocji nauki

Lp.	Działanie	Rok
1.	XIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Z pamiętnika technika kryminalistyki”	2016
2.	XIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Czy długopisy niebiskie na pewno są niebiskie?”	2016
3.	XIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Dlaczego pieczywo jest kwaśne, a miękisz posiada dziury?”	2016
4.	Warsztaty praktyczne dla uczniów reprezentujących województwo lubelskie w zawodach centralnych Olimpiady Biologicznej	2017
5.	XIV Lubelski Festiwal Nauki, – projekt „Czy długopisy niebiskie na pewno są niebiskie?”	2017
6.	Warsztaty praktyczne dla uczniów reprezentujących województwo lubelskie w zawodach centralnych Olimpiady Biologicznej	2018
7.	Dni Otwarte Uniwersytetu „Niespotykane właściwości coca-coli”	2018

8.	XVII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Czy wy wiecie czy nie wiecie - fakty i mity o coca-coli”	2021
9.	XVII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Dlaczego robaczek świętojański świeci?”	2021
10.	Warsztaty „Chemia w eksperymentach - chemiczne łamigłówki” dla uczniów z XXX Liceum Ogólnokształcącego w Lublinie	2022
11.	XVIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Kolorowa chemia”	2022
12.	XVIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Czy wy wiecie czy nie wiecie - fakty i mity o coca-coli”	2022
13.	XVIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Dlaczego robaczek świętojański świeci?”	2022
14.	XVIII Lubelski Festiwal Nauki – projekt „Czy powinno łączyć się pomidora z ogórkiem?”	2022

VII. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Opis pozostałego dorobku naukowo-badawczego

Moja dotychczasowa działalność naukowo-badawcza, poza tematyką omówioną w cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, wpisuje się przede wszystkim w następujące zagadnienia:

1. Opracowanie nowych metod oznaczania związków o działaniu potencjalnie antykancerogennym za pomocą metod elektrochemicznych
2. Wpływ nanocząstek metali na organizm kurcząt i indyków
3. Zastosowanie produktów fermentowanych w żywieniu drobiu i trzody chlewnej
4. Wpływ stosowania antybiotyków i probiotyków na organizm kurcząt i indyków
5. Zastosowanie różnych proporcji argininy i metioniny w stosunku do lizyny w żywieniu indyków
6. Zastosowanie mączek z owadów w żywieniu drobiu

a) Przed uzyskaniem stopnia doktora

Pierwsze opublikowane wyniki badań, wynikające z realizacji pracy magisterskiej, dotyczyły opracowania metody oznaczania niskich stężeń kadmu na błonkowej elektrodzie ołowiowej (**publikacja 1.1.42**). Poprzez zastosowanie elektrochemicznego nakładania błonki ołowiu na elektrodę z węgla szklanego znacznie obniżono granicę wykrywalności tego pierwiastka. Metoda ta może być stosowana do oznaczania kadmu w próbkach wód po ich wstępnej mineralizacji. Dalsze badania związane były z opracowaniem metod oznaczania

kolejnych pierwiastków toksycznych takich jak rtęć (Hg), tal (Tl) oraz chrom (Cr) z wykorzystaniem metod elektrochemicznych głównie woltamperometrii. Tal występuje w środowisku naturalnym w bardzo niskich ilościach, jednak ze względu na jego toksyczne działanie na organizm oraz kumulację w łańcuchach troficznych ważne jest oznaczanie nawet śladowych ilości tego pierwiastka. W próbkach rzeczywistych Tl występuje zawsze w obecności nadmiaru Pb, który przeszkadza w oznaczeniach, gdyż sygnały utleniania tych pierwiastków są bardzo blisko siebie. Zauważono, że dodatek czynnika kompleksującego (EDTA) zmniejsza interferencje pochodzące od Pb. Opracowano metodę oznaczania talu w obecności 0,2 $\mu\text{mol/L}$ Pb(II) w zakresie liniowości krzywej kalibracyjnej 2 – 50 nmol/L. W kolejnych badaniach skupiono się na specjacji pierwiastków, czyli oznaczaniu jednej formy pierwiastka w obecności nadmiaru innej formy tego pierwiastka. Opracowano metodę oznaczania metylortęci (MeHg) - organicznej formy rtęci w obecności nadmiaru formy nieorganicznej (**publikacja 1.1.41**). Metylortęć jest ok 1000 razy bardziej toksyczna od form nieorganicznych tego pierwiastka. Ze względu na katastrofy ekologiczne jest jej dużo w wodach mórz i oceanów, natomiast oznaczanie tych dwóch form pierwiastka obok siebie jest bardzo trudne. Standardowe metody stosowane do oznaczania rtęci pozwalają na oznaczenie jedynie ogólnej zawartości tego pierwiastka. W badaniach własnych zastosowano modyfikację błonkowej elektrody złotej poprzez pokrycie jej warstwą żywicy kationowymiennej Nafionu. Ponadto do roztworu próbki dodawano czynnik kompleksujący DTPA. W takich warunkach jony rtęci nieorganicznej tworzyły kompleksy z DTPA o ładunku ujemnym, natomiast metylortęć pozostawała w roztworze w postaci kationów. Podczas etapu nagromadzenia do powierzchni elektrody poprzez warstwę Nafionu przechodziły tylko kationy metylortęci. Za pomocą tej metody możliwe jest oznaczanie śladowych ilości metylortęci w obecności 2000-krotnego nadmiaru rtęci nieorganicznej. Specjacja jest również bardzo ważna w przypadku chromu. Związku Cr(VI) mają działanie toksyczne i rakotwórcze, natomiast związki Cr(III) są uważane za korzystnie wpływające na funkcjonowanie organizmu. Podczas oznaczeń woltamperometrycznych Cr(VI) w obecności Cr(III) używa się różnych czynników kompleksujących, które mają za zadanie związać Cr(III). W moich badaniach aby poprawić selektywność oznaczeń zastosowany został wstępny rozdział obu form na tlenku glinu. Zoptymalizowano warunki rozdziału Cr(VI) i Cr(III) na kolumieencie wypełnionej tlenkiem glinu oraz warunki prowadzenia oznaczeń. Przy zastosowaniu opracowanej procedury oznaczeń możliwe jest oznaczanie Cr(VI) nawet w obecności 10^4 nadmiaru Cr(III) (**publikacja 1.1.40**).

b) po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora w roku 2012 zostałam zatrudniona na etacie asystenta w Katedrze Biochemii i Toksykologii. Swoje zainteresowania naukowe, które do tej pory skupiały się głównie na opracowaniu nowych metod oznaczania śladowych ilości pierwiastków toksycznych poszerzyłam o badania dotyczące wpływu różnych czynników, w tym toksycznych na organizm zwierząt.

We współpracy z Uniwersytetem Marii Curie Skłodowskiej oraz Uniwersytetem Medycznym w Lublinie opracowałam nowe metody oznaczania związków, które mogą być w przyszłości stosowane w leczeniu nowotworów. Jednym z nich był nowo zsyntezowany przez pracowników Uniwersytetu Medycznego w Lublinie [4-okso-8-(3-chlorofenylo)-4,6,7,8-tetrahydroimidazo[2,1-c][1,2,4]triazyn-3-ylo] octan etylu (ETTA). W swoich badaniach zoptymalizowałam procedurę oznaczania tego związku na błonkowej elektrodzie bizmutowej (skład i pH elektrolitu podstawowego, warunki nanoszenia błonki bizmutu, potencjał i czas nagromadzenia, szybkość skanowania itp.). W zoptymalizowanych warunkach możliwe jest oznaczanie ETTA w zakresie stężeń 2–50 µg/L przy czasie nagromadzenia 300 s. W metodach woltamperometrycznych ważne jest uzyskanie jak najniższych granic wykrywalności. Granica wykrywalności (LOD) dla ETTA dla 300 s czasu nagromadzenia wynosiła 0,4 µg/L. Zaproponowana łatwa, czuła i niedroga metoda została z powodzeniem zastosowana do oznaczania ETTA w surowicy krwi po ekstrakcji metodą SPE (**publikacja 1.1.28**). We współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie opracowano również kolejne procedury oznaczania proleku (2E)-2-[(2E)-[1-(4-metylofenylo)imidazolidyno-2ylideno]hydrazynylideno]butanodionianu dietylu (DIB). Substancja ta ma również działanie antynowotworowe potwierdzone w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych. Do oznaczania tej substancji wykorzystano dwie elektrody błonkowe - elektrodę z węgla szklatego modyfikowaną błonką bizmutu (BiF/GCE) i elektrodę z węgla szklatego modyfikowaną błonką ołowiu (PbF/GCE). Ponadto po raz pierwszy zaproponowano mechanizm wzmocnienia elektronów do elektrochemicznej redukcji DIB na obu opracowanych elektrodach. Porównano parametry walidacyjne uzyskane podczas oznaczania DIB na obu elektrodach i zakres liniowości krzywej kalibracyjnej był szerszy na PbF/GCE - 9–900 µg/L przy czasie nagromadzenia 10 s (LOD = 1,5 µg/L i LOQ = 5,0 µg/L). Zoptymalizowane procedury oznaczania mogą być stosowane do oznaczania DIB w preparatach farmaceutycznych (**publikacja 1.1.14**).

Moje zainteresowania badawcze koncentrują się również na wpływie nanocząstek metali na organizm kurcząt i indyków. W trakcie doświadczeń przeprowadzonych na kurczętach brojlerach i indykach badano wpływ nanocząstek srebra, miedzi, manganu i cynku na organizm tych zwierząt.

Przeciwdrobnoustrojowe właściwości Ag i jego związków były znane i wykorzystywane od tysiącleci, pełniąc tę funkcję aż do wynalezienia antybiotyków. W ostatnich latach nastąpił jednak powrót do stosowania Ag jako środka bakteriobójczego w postaci roztworów, zawiesin nanocząstek bądź obu postaci. Wpływ nanocząstek srebra (Ag-NPs) na organizm kurcząt brojlerów zbadano w 3 doświadczeniach. W doświadczeniu 1 kurczęta podzielono na 7 grup doświadczalnych. Grupa kontrolna nie otrzymywała Ag-NPs, natomiast pozostałe kurczęta otrzymywały hydrokoloid Ag-NPs w stężeniu 5 mg/L w wodzie do picia w 1 cyklu \times 7 dni (8–14 dzień życia) dla D1 (2,87 mg/szt.) lub w 2 cyklach \times 7 dni (8–14 dzień życia i 36-42 dzień życia) dla D2 (12,25 mg/szt.) oraz w 3 rozmiarach nanocząstek 5, 25 lub 40 nm (odpowiednio S-5, S-25 i S-40). Wyniki uzyskanych badań pokazały, że dodatek Ag-NPs do wody nie poprawił parametrów wzrostowych ptaków, jednak nanocząstki Ag niezależnie od zastosowanego rozmiaru kumulowały się w jelicie i wątrobie. Wszystkie dawki i rozmiary Ag-NPs stymulowały układ odpornościowy (z wyjątkiem podania S-40(D1)) i nasilały stres oksydacyjny w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano również, że doustne podawanie Ag-NPs kurczętom wpływa na morfologię przewodu pokarmowego oraz parametry statusu immunologicznego i redoks, natomiast efekt ten zmienia się w zależności od dawki i wielkości zastosowanych Ag-NPs (**publikacja 1.1.25**).

W doświadczeniu 2 grupa kontrolna nie otrzymywała Ag-NPs, natomiast kurczęta z grup T-5 i T-10 otrzymywały hydrokoloid Ag-NPs w stężeniu 5 mg/L (grupy T-5) lub 10 mg/L (grupy T-10) w różnym czasie od drugiego tygodnia życia. Podawanie Ag-NPs w stężeniu 5 mg/L lub 10 mg/L w zakresie dawek 2,87–12,25 mg/szt. powodowało efekt immunostymulujący, wyrażający się zwiększeniem wyrzutu oddechowego u heterofilów oraz zwiększeniem stężenia lizozymu. Z kolei wyższe dawki Ag-NP miały działanie prozapalne, na co wskazywały podwyższone poziomy IL-6 i ceruloplazminy, a także wysokie OB. Stymulowały również limfocyty B do produkcji immunoglobulin IgA i IgA (**publikacja 1.1.26**). Niezależnie od stężenia, podawanie Ag-NPs (5 nm) w dawce nieprzekraczającej 54 mg/szt. nie miało negatywnego wpływu na wyniki wzrostowe kurcząt. Ponadto stosowanie Ag-NPs w ilości od 2,87 do 63,74 mg/szt. nie powodowało gromadzenia się Ag w mięśniu piersiowym. Stwierdzono także, że spożycie przez kurczęta 2,87 mg/szt. Ag-NPs powoduje

kumulację tego pierwiastka w ścianie jelita cienkiego i w wątrobie. Podawanie Ag-NPs (5 nm), zwłaszcza w dawkach większych niż „poziom, przy którym nie obserwuje się szkodliwych skutków” (NOAEL) wynoszący 9,47 mg/szt., może indukować reakcje oksydacyjne we krwi, ścianie jelita cienkiego, wątrobie i mięśniu piersiowym kurcząt (**publikacja 1.1.19**).

W doświadczeniu 3 kurczęta podzielono na 7 grup doświadczalnych. Grupa kontrolna nie otrzymywała Ag-NPs, natomiast kurczęta z pozostałych grup otrzymywały nanocząstki Ag (0,5, 1,0 lub 1,5 mg/kg m.c./dzień) przez rurkę do wola w trzech 3-dniowych okresach (8–10, 22–24 i 36–38 dzień życia) lub trzech 7 -dniowych okresach (d 8-14, 22-28 i 36-42 dzień życia). Wchłanianie składników mineralnych zbadano za pomocą techniki worka żołądkowo-jelitowego *in vitro*. Stwierdzono, że dostarczane drogą pokarmową nanocząstki Ag prowadziły do zależnej od dawki kumulacji Ag w ścianach jelit, a Ag skumulowane w jelitach nie zaburzało wchłaniania Ca, ale zmniejszało wchłanianie K i Fe (**publikacja 1.1.30**).

Wyniki badań dotyczące wpływu nanocząstek Ag na wchłanianie jelitowe innych elementów mineralnych skłoniło nas do zbadania wpływu stosowania nanocząstek złota lub nanocząstek miedzi na wchłanianie jelitowe pierwiastków. W tym celu przeprowadzono doświadczenie na kurczętach brojlerach, w którym grupa kontrolna nie otrzymywała nanocząstek złota, natomiast grupy: Au-5(7), Au-10(7) i Au-15(7) otrzymywały nanocząsteczki złota w ilości 5 mg/L dla grupy Au-5(7), 10 mg/L dla grupy Au-10(7) i 15 mg/L dla grupy Au-15(7) w 8–14, 22 28 i 36–42 dniu życia. Natomiast ptaki z grup Au-5(3), Au-10(3) i Au-15(3) otrzymywały nanocząsteczki złota w takich samych ilościach, ale tylko w 8–10, 22–24 i 36–38 dniu życia. Stwierdzono, że nanocząstki złota dostarczane drogą pokarmową prowadzi, do zależnej od dawki i czasu, kumulacji złota w ścianach jelit, a złoto obecne w jelicie czczym ma negatywny wpływ na wchłanianie wapnia, żelaza i potasu w warunkach *in vitro* (**publikacja 1.1.32**).

Badania własne wykazały, że również nanocząstki miedzi stosowane jako suplement diety dla drobiu mogą również wpływać na absorpcję składników mineralnych. Doświadczenie przeprowadzono na kurczętach przydzielonych do siedmiu grup doświadczalnych. Grupa kontrolna (G-C) nie otrzymywała nanocząstek miedzi. Grupy: Cu-5(7), Cu-10(7), i Cu-15(7) otrzymywały nanocząstki miedzi w wodzie pitnej w ilości: 0,5 mg/kg m.c./dzień dla grupy Cu-5(7), 1,0 mg/kg m.c./dzień dla grupy Cu-10(7) lub 1,5 mg/kg m.c./dzień dla grupy Cu-15(7) w okresie od 8 do 14, od 22 do 28 i od 36 do 42 dnia życia ptaków. Ptaki z grup Cu-5(3), Cu-10(3) i Cu-15(3) otrzymywały nanocząstki miedzi w takich samych ilościach, ale tylko w czasie od 8 do 10, od 22 do 24 i od 36 do 38 dnia życia.

Wchłanianie składników mineralnych badano podobnie jak w przypadku nanocząstek srebra i złota techniką worka żołądkowego *in vitro*. Stwierdzono, że podawanie kurczętom nanocząstek miedzi w ilości 0,5; 1,0 i 1,5 mg/kg m.c./dzień doprowadziło do kumulacji tego pierwiastka w ścianach jelita. Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że Cu skumulowana w jelitach zmniejsza wchłanianie wapnia i cynku, ale nie wpływa na wchłanianie żelaza (**publikacja 1.1.34**). W grupie otrzymującej dodatek nanocząstek Cu w ilości 0,5 mg/kg m.c./dzień przez 3 dniowe okresy w trakcie odchowu odnotowano zmniejszenie niedoboru Cu z 28,7 do 11% w stosunku do poziomu zalecanego przez NRC (1994). W pozostałych grupach średnie dzienne spożycie Cu przekraczało zalecane spożycie od 7% do prawie 100%. Suplementacja diety kurcząt nanocząstkami Cu skutkowała zwiększeniem zawartości Cu w wątrobie i mięśniu piersiowym przy jednoczesnym zmniejszeniu zawartości Zn. Uzupełnienie diety kurcząt nanocząstkami Cu do poziomu przekraczającego poziom Cu zalecany przez NRC o 7% do 25% zwiększyło potencjał antyoksydacyjny wątroby i mięśnia piersiowego. Stwierdzono, że status antyoksydacyjny wątroby i mięśni piersiowych kurcząt można poprawić poprzez uzupełnienie standardowej diety zawierającej siarczan miedzi dodatkiem nanocząstek Cu, jednak do poziomu nieprzekraczającego 25% zawartości miedzi dla kurcząt brojlerów zalecanej przez NRC (1994). Spośród zastosowanych dawek najbezpieczniejszy okazał się poziom nanocząstek Cu nieprzekraczający 7% zawartości miedzi zalecanej przez NRC (1994) (**publikacja 1.1.15**).

Kolejnym problemem badawczym było ustalenie, czy zastosowanie nanocząstek Mn umożliwi obniżenie poziomu tego pierwiastka w paszy dla indyków bez negatywnego wpływu na wyniki wzrostowe, status antyoksydacyjny i immunologiczny ptaków. Doświadczenie przeprowadzono w układzie dwuczynnikowym z 3 dawkami manganu 100, 50 i 10 mg/kg oraz 2 formami: tlenkiem manganu (MnO) i nanocząstkami manganu (NP-Mn₂O₃). Stwierdzono, że niezależnie od zastosowanej formy Mn, obniżenie poziomu Mn zalecanego przez British United Turkeys (BUT) dla diety młodych indyków ze 100 g do 10 mg/kg skutkowało zwiększeniem zawartości tego pierwiastka we krwi bez negatywnego wpływu na wydajność wzrostu lub układ odpornościowy. Zmniejszenie suplementacji Mn w postaci NP-Mn₂O₃ ze 100 do 50, a nawet do 10 mg/kg diety indyków nie wpływało negatywnie na obronę antyoksydacyjną młodych indyków. Natomiast zmniejszenie o 50% zalecanego poziomu Mn w postaci MnO nasilało procesy utleniania lipidów. (**publikacja 1.1.27**). Stwierdzono, zastąpienie MnO nanocząstkami NP-Mn₂O₃ poprawiło strawność Mn w jelicie krętym. Ponadto niezależnie od zastosowanej formy, zmniejszenie poziomu suplementacji Mn w diecie ze 100 mg/kg do 50 lub 10 mg/kg zmniejszyło strawność tego

pierwiastka w jelicie krętym i zwiększyło jego gromadzenie w wątrobie, mięśniach piersiowych i skórze. Dodatkowo stwierdzono, że Mn ma wpływ na wchłanianie i kumulację innych elementów mineralnych, gdyż zmniejszenie dodatku Mn do diety indyków zwiększyło jelitowe wchłanianie Zn oraz zmniejszyło gromadzenie się Zn i Cu w wątrobie, mięśniach piersiowych i skórze. Odnotowano również, że zmniejszenie dodatku Mn do diety indyków pobudziło układ odpornościowy, co objawiło się pobudzeniem limfocytów B do produkcji immunoglobulin i uwolnieniem cytokiny IL-6 (**publikacja 1.1.18**). Ponadto stwierdzono, że niezależnie od zastosowanej dawki Mn w postaci NP-Mn₂O₃ zmniejszał nitrowanie białek bardziej niż Mn w postaci MnO. Również zmniejszenie dawki Mn w diecie ze 100 do 50 mg/kg, a następnie do 10 mg/kg jest niekorzystne, ponieważ proporcjonalnie zwiększa utlenianie białek i DNA w komórkach, zmniejsza aktywność enzymów antyoksydacyjnych i zwiększa poziom glutationu. Dodatkowo zmniejszenie dawki Mn ze 100 do 10 mg/kg zwiększa globalną metylację DNA. Redukcja poziomu Mn, niezależnie od zastosowanej formy, jest niekorzystna, ponieważ osłabia obronę systemu antyoksydacyjnego, co w konsekwencji może indukować procesy oksydacyjne w komórkach. Chociaż Mn w postaci NP-Mn₂O₃ redukuje nitrowanie białek lepiej niż w postaci MnO, zastosowanie nanocząstek manganu w żywieniu indyków (nawet w mniejszych dawkach) wymaga dalszych badań (**publikacja 1.1.17**).

Celem kolejnych badań dotyczących stosowania nanocząstek było określenie skuteczności łącznego zastosowania nanocząstek Cu, Zn i Mn w diecie indyków pod kątem potencjalnego obniżenia zawartości tych pierwiastków w paszach. Doświadczenie przeprowadzono na indyczkach przydzielonych do czterech grup. Indyki z grupy PC otrzymywały paszę z dodatkiem nieorganicznych form Cu, Zn i Mn w ilościach rekomendowanych przez B.U.T., z grupy IR otrzymały dodatek w ilościach obniżonych do 10% zalecanego poziomu, a z grupy NR dodatek pierwiastków w postaci nanocząstek w takich samych ilościach jak w grupie IR. Indyki z grupy NC otrzymywały paszę bez dodatku tych pierwiastków. Badania wykazały, że dodatek Cu, Zn i Mn do pasz dla indyków, zarówno w postaci nieorganicznej, jak i nanocząsteczek, w ilościach pokrywających zaledwie 10% B.U.T. zalecenia nie miały negatywnego wpływu na wydajność wzrostu ani na potencjał antyoksydacyjny i obronę immunologiczną indyków. Dodatkowo stwierdzono, że zmiany statusu redoks u indyków, których dieta nie była uzupełniana Cu, Zn i Mn wskazują na zmniejszenie procesów utleniania w tkankach (**publikacja 12**).

Kolejnym tematem moich zainteresowań naukowych było ustalenie możliwości zastosowania produktów fermentowanych w żywieniu zwierząt. W doświadczeniu 1 zbadano

wpływ różnych poziomów fermentowanej śruty sojowej na wydajność wzrostu, morfologię jelit, wskaźniki metaboliczne i odporność u indyków. Doświadczenie przeprowadzono na indyczkach przydzielonych do 4 grup doświadczalnych. Paszą dla grupy kontrolnej (FSBM0) była mieszanka standardowa bez fermentowanej śruty sojowej. Dla indyków z grup FSBM7, FSBM9 i FSBM10 dieta zawierała odpowiednio 70, 90 lub 100 g fermentowanej śruty sojowej (FSBM) na 1 kg paszy. Badania wykazały, że dodanie sfermentowanej śruty sojowej do paszy dla indyków w ilości 7% poprawiło histologię jelit i pobudziło układ odpornościowy i antyoksydacyjny. Stwierdzono, że zastosowanie wyższego poziomu FSBM (9% i 10%) w diecie indyków poprawiło wyniki wzrostowe i korzystnie wpłynęło na histologię jelita cienkiego. Ponadto włączenie do diety 10% FSBM korzystnie wpłynęło na parametry krwinek czerwonych, ale negatywnie na czynność wątroby i nerek (wzrost aktywności aminotransferaz, zawartości glukozy i kreatyniny we krwi indyków). Odnotowano, że 10% udział FSBM w paszy przyczynił się do niekorzystnego nasilenia reakcji oksydacyjnych i zapalnych, czego wyrazem był wzrost zawartości dialdehydu malonowego, nadtlenków lipidowych oraz prozapalnej interleukiny-6 (**publikacja 1.1.16**).

Badania dotyczące zastosowania produktów fermentowanych przeprowadzono również na trzodzie chlewnej. Miały one na celu określenie, w jaki sposób fermentowana śruta rzepakowa (FRSM) podawana ciężarnym lochom wpływa na status antyoksydacyjny i immunologiczny prosiąt. Zwierzęta podzielono na 4 grupy. Grupy kontrolne pierwiastek (CG) i wieloródek (CS) otrzymywały standardową dietę dla ciężarnych lub karmiących loch. Grupy doświadczalne loch pierwiastek (EG) i wieloródek (ES) otrzymywały paszę z 4% udziałem FRSM zamiast śruty sojowej do 100 dnia ciąży, 9% udziałem FRSM od 100 dnia ciąży do 7 dnia laktacji, a następnie ponownie 4% udziałem FRSM do końca laktacji. Stwierdzono, że dodatek FRSM do paszy dla loch istotnie stymuluje procesy antyoksydacyjne u pierwiastek i wieloródek oraz ich prosiąt. (**publikacja 1.1.1**).

W swoich badaniach skupiłam się również na badaniach wpływu stosowania antybiotyków i probiotyków u drobiu. Nadmierne stosowanie antybiotyków jest kontrowersyjne i może prowadzić do rozprzestrzeniania się zakażeń lekoopornych zarówno u ptaków, jak i u ludzi. W prezentowanych badaniach porównano wpływ stosowania w pierwszym tygodniu życia antybiotyku enrofloksacyny lub probiotyku zawierającego szczep *Enterococcus faecium* i *Bacillus amyloliquefaciens* na organizm kurcząt. Wykonano doświadczenie w którym grupa kontrolna nie otrzymywała żadnych dodatków w wodzie pitnej (GC); grupa GP otrzymywała przez pierwsze 5 dni życia, preparat probiotyczny zawierający *E. faecium* i *B. amyloliquefaciens*, grupa GA otrzymywała antybiotyk

(enrofloksacyna 0,5 ml/L wody) przez pierwsze 5 dni życia. Stwierdzono, że zastosowanie zarówno enrofloksacyny, jak i probiotyku zawierającego szczepy *E. faecium* i *B. amyloliquefaciens* u kurcząt w pierwszym tygodniu życia poprawiło integralność jelit i zmniejszyło stany zapalne oraz zmiany oksydacyjne i epigenetyczne w jelicie cienkim. Efekt ten był widoczny zarówno w 6 dniu życia, jak i pod koniec okresu odchowu (**publikacja 1.1.11**). Podawanie antybiotyku enrofloksacyny lub probiotyku zawierającego szczepy *E. faecium* i *B. amyloliquefaciens* kurczętom w pierwszym tygodniu życia wywiera wyraźny wpływ immunomodulujący na humoralne i komórkowe mechanizmy obronne u tych ptaków. Stwierdzono, że wczesne podanie enrofloksacyny może stwarzać ryzyko osłabienia odporności humoralnej, na co wskazuje znaczny spadek całkowitego stężenia IgY w osoczu kurcząt (**publikacja 1.1.2**).

W hodowli drobiu poszukuje się dodatków do diety lub wody, których podawanie będzie skutkowało poprawą zdrowia ptaków, a co za tym idzie wydajności wzrostu. Coraz większe nadzieje na uzyskanie takich efektów pokłada się w dodatkach roślinnych, zwanych fitobiotykami, które jako naturalne dodatki są bezpieczne zarówno dla zdrowia ptaków, jak i nie pozostawiają toksycznych pozostałości w produktach końcowych (mięsie i jajach). W prezentowanych badaniach założono, że preparat fitobiotyczny zawierający olejek cytrynowy i kwas cytrynowy dodany do wody pitnej dla kurcząt w odpowiedniej ilości i przez odpowiedni czas korzystnie modyfikuje skład i morfologię mikrobiomu jelita cienkiego, poprawiając w ten sposób odporność i wydolność wzrostową bez indukowania zaburzeń metabolizmu. Doświadczenie przeprowadzono na kurczętach przydzielonych do siedmiu grup doświadczalnych. Grupa kontrolna (G-C) nie otrzymywała fitobiotyku. Grupy CT-0.05, CT-0.1 i CT-0.25 otrzymywały fitobiotyk w wodzie do picia w ilości odpowiednio 0,05; 0,1 i 0,2 ml/L w okresie od 1 do 42 dnia życia (aplikacja ciągła, CT). Ptaki z grup PT-0.05, PT-0.5 i PT-0.25 otrzymywały fitobiotyk w takich samych ilościach, ale tylko w 1–7, 15–21 i 29–35 dniu życia (aplikacja okresowa, PT). Stwierdzono, że dodatek fitobiotyku zawierającego olejek cytrynowy i kwas cytrynowy do wody pitnej kurcząt w odpowiedniej dawce i przez odpowiedni czas może korzystnie modyfikować skład mikrobiomu i morfometrię jelita cienkiego poprawiając odporność i wydolność wzrostową kurcząt. Spośród trzech badanych dawek (0,05, 0,1 i 0,25 ml/L wody) preparatu zawierającego olejek cytrynowy najkorzystniejsze okazało się podawanie 0,25 ml/L przez 42 dni, gdyż kurczęta z tej grupy cechowały się lepszą wydajnością wzrostu. Było to związane z korzystnym wpływem preparatu na mikrobiom jelita cienkiego, metabolizm oraz status immunologiczny oraz układ antyoksydacyjny kurcząt (**publikacja 1.1.5**).

Kolejnym tematem badawczym było ustalenie optymalnych poziomów i proporcji lizyny (Lys), argininy (Arg) i metioniny (Met) w mieszankach paszowych, które pozwolą na optymalne wykorzystanie potencjału wzrostowego indyków rzeźnych i ograniczą zaburzenia metaboliczne. Przeprowadzone doświadczenie miało układ czynnikowy 3×2 z trzema poziomami Arg (90%, 100% lub 110%) i dwoma poziomami Met (30% lub 45%), w stosunku do zawartości Lys w diecie. Odnotowano wpływ poziomu Arg na metabolizm lipidów. Stwierdzono, że najniższa zawartość Arg (90% Lys) w diecie spowodowała wzrost poziomu cholesterolu całkowitego w osoczu indyków w porównaniu z wyższą zawartością Arg (100% lub 110% Lys), dodatkowo stężenie HDL w osoczu wzrastało u indyków karmionych paszami o wyższej zawartości Arg (100% i 110% Lys) w porównaniu z indykami karmionymi dietą o najniższej zawartości Arg (90% Lys). W porównaniu z indykami o najniższej i pośredniej zawartości Arg (90% i 100% Lys), dieta z najwyższą zawartością tego Arg (110% Lys) spowodowała wzrost poziomu T4 w osoczu. Stwierdzono, że zróżnicowane poziomy Arg i Met w stosunku do Lys nie wpływały na wydzielanie neuroprzekaźników ani hormonów regulujących metabolizm glukozy. Jednak przy niskim poziomie Met w diecie spadek Arg w stosunku do Lys ze 100% do 90% powodował zahamowanie wzrostu indyków, czego nie odnotowano w przypadku wyższej zawartości Met (**publikacja 1.1.7**). W porównaniu z indykami żywionymi dietami o umiarkowanej zawartości Arg (100% zawartości Lys), spadek poziomu Arg w diecie (90% zawartości Lys) prowadził do obniżenia stężenia 3-nitrotyrozyny (3-NT) w osoczu, natomiast wzrost poziomu Arg w diecie (110% zawartości Lys) prowadził do wzrostu stężenia 3-NT w osoczu. Odnotowano, że w porównaniu z indykami żywionymi dietami o umiarkowanej zawartości Arg (100% zawartości Lys), najniższy poziom Arg w diecie (90% zawartości Lys) powodował obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w ścianie jelita oraz w wątrobie, zwiększenie aktywności SOD we krwi i w mięśniach piersiowych oraz zwiększenie stężenia dialdehydu malonowego w mięśniach piersiowych. Wzrost zawartości Met z 30 do 45% zawartości Lys spowodował spadek stężenia pochodnych karbonylowych w białkach osocza i aktywności katalazy w mięśniach piersiowych oraz wzrost aktywności SOD w wątrobie. Stwierdzono, że najwyższy poziom Arg w diecie (110% zawartości Lys) nie indukował utleniania lipidów, białek ani DNA, ale zwiększał ryzyko nitrowania białek. Najniższy poziom Arg w diecie (90% zawartości Lys) pogarszał status antyoksydacyjny indyków. Odnotowano, że niezależnie od poziomu Arg w diecie, wzrost zawartości Met z 30 do 45% zawartości Lys stymulował antyoksydacyjny system obronny indyków. Stosując zalecany przez NRC poziom Lys w diecie indyków, optymalny poziom Arg wynosi 100%, a Met 45% w porównaniu z Lys (**publikacja 1.1.8**).

W doświadczeniu 2 przyjęto hipotezę, że odpowiednia proporcja pokarmowa argininy (Arg) do lizyny Lys) może poprawić stan immunologiczny i wydajność wzrostową indyków. Doświadczenie przeprowadzono na indykach przydzielonych do czterech grup z dwoma poziomami Lys (niski = zalecenie NRC lub wysoki = NRC + 10%) i dwoma poziomami Arg (95% lub 105% Arg w stosunku do zawartości Lys w diecie) . Stwierdzono, że zawartość Lys w paszach dla indyków powinna być o 10% wyższa niż zalecana przez NRC i w połączeniu z wyższym poziomem Arg (105% Lys). Chociaż powyższy stosunek Arg:Lys nie poprawiał wydajności wzrostowej ptaków, stymulował ich układ odpornościowy i zmniejszał nitrowanie białek oraz utlenianie białek i DNA (**publikacja 1.1.9**)

W swoich badaniach skupiłam się również na możliwości zastąpienia białka roślinnego stosowanego w żywieniu drobiu poprzez stosowanie mączek z owadów. Przeprowadzono doświadczenie na indykach, w którym diety podstawowej dodano pełnotłuste mączki otrzymane z owadów *Tenebrio molitor* (TM) lub *Hermetia illucens* (HI) w ilości 3 g/kg. Uzyskane wyniki porównano z grupą kontrolną nie otrzymującą tych dodatków oraz grupą otrzymującą dodatek monenzyny (MON). Wprowadzenie dodatku do diety pełnotłustych mączek z owadów nie poprawiało wyników produkcyjnych tak jak monenzyna, ale zadziałało przeciwzapalnie, immunostymulująco i antyoksydacyjnie wywołując korzystne zmiany we krwi indyków. Stwierdzono, że dodatek HI i TM spowodował korzystne obniżenie zawartości cholesterolu całkowitego we krwi oraz wzrost fosforu, czego nie odnotowano przy stosowaniu MON. Uzyskane wyniki wykazały, że w porównaniu z dietą kontrolną bez dodatków, dodatki MON, TM i HI wykazywały nioselektywne właściwości bakteriostatyczne, bez niekorzystnej intensyfikacji fermentacji białek i wzrostu pH treści pokarmowej w jelicie ślepym młodych indyków. Odnotowano, że dodatek TM i HI podobnie jak MON zmniejszył aktywność enzymatyczną mikrobiomu jelita ślepego oraz obniżył stężenie wszystkich krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych z wyjątkiem masłowego w jelicie ślepym. Stwierdzono, że dodatek 3 g/kg pełnotłustych mączek z owadów, zwłaszcza *Hermetia illucens*, wywarł znacznie silniejsze działanie przeciwzapalne, immunostymulujące i przeciwutleniające niż powszechnie stosowana monenzyna (**publikacja 1.1.4**).

W kolejnych badaniach skupiono się na włączeniu różnego udziału mączek z *Hermetia illucens* do diety indyków. Wykonano doświadczenie w którym indyki karmiono dietą kontrolną (HI0) bez mączki z owadów oraz trzema dietami o zwiększonej zawartości *Hermetia illucens* (HI) o 5%, 10% i 15% (grupy HI5, HI10 i HI15). Stwierdzono, że stosowanie 10% lub 15% HI w diecie młodych indyków, przy korzystnym zwiększeniu poziomu P, Fe i hemoglobiny, ma negatywny wpływ na gospodarkę lipidową, zwiększając

poziom cholesterolu całkowitego, powodując utlenianie lipidów i odkładanie tłuszczu w wątrobie. Natomiast włączenie 5% HI do diety młodych indyków nie wpływa niekorzystnie na stan lipidowy i histologiczny wątroby, ale nie poprawia statusu antyoksydacyjnego. Stwierdzono że, poziom mączki HI w diecie indyków nie powinien przekraczać 5% (**publikacja 1.1.10**).

Zbadano również wpływ stosowanie mączki z *Hermetia illucens* na czynność jelit. Włączenie *Hermetia illucens* do diety spowodowało zwiększenie zawartości suchej masy (DM) i lepkości treści jelita cienkiego. Najwyższy udział *Hermetia illucens* nie wpłynął na poziomy IgA, ale zwiększył poziomy IgY w tkance jelita cienkiego w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie stosowanie *Hermetia illucens* zadziało przeciwzapalne poprzez zmniejszanie poziomu TNF α i zwiększanie poziomu IL-6 w tkance jelita cienkiego. Odnotowano, że włączenie *Hermetia illucens* do diety korzystnie zwiększyło aktywność wybranych enzymów drobnoustrojów (α -galaktozydazy, β -glukozydazy i β -glukuronidazy) oraz stężenie kwasu masłowego w jelicie ślepym. Zwiększenie poziomu inkluzji *Hermetia illucens* nie wpłynęło na ostateczną masę ciała (BW) ani przyrost masy ciała (BWG) ptaków, ale spowodowało zmniejszenia współczynnika wykorzystania paszy (FCR). (**publikacja 1.1.6**).

W swoich badaniach zajmowałam się również oznaczaniem różnych substancji w roślinach i produktach roślinnych. Część badań była skoncentrowana na wpływie sposobu uprawy na jakość ziarna i skład chemiczny pszenicy, jęczmienia czy grochu (**publikacje 1.1.23, 1.1.31, 1.1.33, 1.1.37-1.1.39**). Zajmowałam się również oznaczaniem naturalnych antyoksydantów oraz elementów mineralnych w różnych odmianach dyni (**publikacja 1.1.12, 1.1.24**), winach wytworzonych z owoców jagodowych (**publikacja 1.1.35**), hiszpańskich odmianach karczocha kulistego (**publikacja 1.1.21**) oraz w paszach (**publikacja 1.1.36**).

Podsumowanie dorobku naukowego

Zestawienie dorobku naukowego wg. liczby pozycji bibliograficznych, wartości IF z uwzględnieniem punktów MEiN, przed oraz po uzyskaniu stopnia doktora przedstawiono w poniższym zestawieniu tabelarycznym.

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora		Po uzyskaniu stopnia doktora				Ogółem	
			Jednotematyczny cykl publikacji		Pozostałe publikacje			
	IF	MEiN	IF	MEiN	IF	MEiN	IF	MEiN
Prace oryginalne w czasopismach z bazy JCR	7,922	87 (3)	17,422	600 (5)	87,380	2835 (39)	112,744	3522
Prace oryginalne w czasopismach spoza bazy JCR						7 (1)	-	7
Artykuły przeglądowe w czasopismach spoza bazy JCR						28 (2)		28
Doniesienia i komunikaty		- (6)				- (46)		
Rozdziały w monografiach						130 (14)		130
Ogółem							112,744	3687

W trakcie dotychczasowej pracy naukowej, byłam kierownikiem jednego projektu badawczego, a także wykonawcą 3 projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

Ponadto pełniłam funkcję recenzenta 19 publikacji naukowych wyszczególnionych w JCR tj. Veterinary Sciences (1), BMC Veterinary Research(1), International Journal of Nanomedicine (1), Agriculture (1), Scientific Reports (1), Animals (5), PLOS ONE (1), Plants (1), Phytotherapy Research (1), Molecules (2), International Journal of Vegetable Science (1), Environmental Research (1), Antioxidants (1), Foods(1).

Prowadzona działalność naukowa pozwoliła na uzyskanie nagrody JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za osiągnięcia naukowe w latach 2019-2021. Ponadto, w 2021 uzyskałam zespołowe Wyróżnienie Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk za osiągnięcie naukowe „Technologie pozwalające na istotne obniżenie emisji gazów cieplarnianych, azotu i fosforu do środowiska naturalnego bez negatywnego wpływu na wyniki produkcyjne drobiu”. W 2022 roku zostałam uhonorowana nagrodą zespołową Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk za osiągnięcie naukowe „Antyoksydacyjne i immunostymulujące oddziaływanie zróżnicowanych poziomów i wzajemnego stosunku lizyny, argininy i metioniny w mieszankach dla indyków rzeźnych”.

Lublin, 20.03.2023 r.



PODPIS ZAUFANY

ANNA KATARZYNA
STĘPNIOWSKA

20.03.2023 13:58:59 (GMT+1)

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Załącznik nr 4

WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH, STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ OKREŚLONEJ DYSCYPLINY

dr Anna Katarzyna Stępniewska

KATEDRA BIOCHEMII I TOKSYKOLOGII

WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI

UNIwersytet PRZYRODNICZY W LUBLINIE

ul. Akademicka 13,

20-950 Lublin

e-mail: anna.stepniowska@up.lublin.pl

Lublin, 2023

**I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH,
O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY**

CYKL POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH, ZGODNIE Z
ART. 219 UST. 1. PKT 2B USTAWY

Lp.	Publikacja	IF	MEiN
I.1.	<p>Stępniewska A., Tutaj K., Juśkiewicz J., Ognik K. Effect of a high-fat diet and chromium on hormones level and Cr retention in rats. <i>J. Endocrinol. Invest.</i> 2022, 45, 527-535. DOI: 10.1007/s40618-021-01677-3</p> <p><i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i></p>	5,467	100
I.2.	<p>Stępniewska A., Juśkiewicz J., Tutaj K., Fotschki J., Fotschki B., Ognik K. Effect of chromium picolinate and chromium nanoparticles added to low- or high-fat diets on chromium biodistribution and the blood level of selected minerals in rats. <i>Pol. J. Food Nutr. Sci.</i> 2022, 72, 229-238. DOI: 10.31883/pjfn/151750</p> <p><i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i></p>	2,736	100
I.3.	<p>Stępniewska A., Tutaj K., Drażbo A., Kozłowski K., Ognik K., Jankowski J. Estimated intestinal absorption of phosphorus and its deposition in chosen tissues, bones and feathers of chickens receiving chromium picolinate or chromium nanoparticles in diet. <i>PloS One</i> 2020, 15, e0242820. DOI: 10.1371/journal.pone.0242820</p> <p><i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i></p>	3,240	100
I.4.	<p>Ognik K., Drażbo A., Stępniewska A., Kozłowski K., Listos P., Jankowski J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in broiler chicken diet on the performance, redox status and tissue histology. <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> 2020, 259, 114326. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2019.114326</p> <p><i>Brałam udział w opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz napisaniu manuskryptu.</i></p>	3,247	200
I.5.	<p>Stępniewska A., Drażbo A., Kozłowski K., Ognik K., Jankowski J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in the diet of chickens on levels of selected hormones and tissue antioxidant status. <i>Animals</i> 2020, 10, 45. DOI: 10.3390/ani10010045</p> <p><i>Byłam odpowiedzialna za koncepcję, hipotezę i metodologię badań oraz napisanie manuskryptu i przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny), a także brałam udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.</i></p>	2,752	100

II. INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

1.1 Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC).

Lp.	PRACE WYDANE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	IF	MEiN
1.1.1	Czech A., Stępniewska A. , Kiesz M. Effect of fermented rapeseed meal as a feed component on the redox and immune system of pregnant sows and their offspring. <i>Ann. Anim. Sci.</i> 2022, 22, 201-219. DOI: 10.2478/aoas-2021-0034	2,667	140
1.1.2	Jankowski J., Tykałowski B., Stępniewska A. , Konieczka P., Koncicki A., Matusевич P., Ognik K. Immune parameters in chickens treated with antibiotics and probiotics during early life. <i>Animals</i> 2022, 12, 1133. DOI: 10.3390/ani12091133	3,231	100
1.1.3	Gawryluk A., Stępniewska A. , Lipińska H. Effect of soil contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons from drilling waste on germination and growth of lawn grasses. <i>Ecotoxicol. Environ. Saf.</i> 2022, 236, 113492. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113492	7,129	100
1.1.4	Kozłowski K., Ognik K., Stępniewska A. , Juśkiewicz J., Zduńczyk Z., Kierończyk B., Benzertiha A., Józefiak D., Jankowski J. Growth performance, immune status and intestinal fermentative processes of young turkeys fed diet with additive of full fat meals from <i>Tenebrio molitor</i> and <i>Hermetia illucens</i> . <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> 2021, 278, 114994. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.114994	3,313	200
1.1.5	Krauza M., Cendrowska-Pinkosz M., Matusевич P., Stępniewska A. , Jurczak P., Ognik K. The effect of administration of a phytobiotic containing cinnamon oil and citric acid on the metabolism, immunity, and growth performance of broiler chickens. <i>Animals</i> 2021, 11, 399. DOI: 10.3390/ani11020399	3,231	100
1.1.6	Jankowski J., Kozłowski K., Zduńczyk Z., Stępniewska A. , Ognik K., Kierończyk B., Józefiak D., Juśkiewicz J. The effect of dietary full-fat <i>Hermetia illucens</i> larvae meal on gut physiology and growth performance in young turkeys. <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> 2021, 275, 114879. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.114879	3,313	200
1.1.7	Ognik K., Całyniuk Z., Mikulski D., Stępniewska A. , Konieczka P., Jankowski J. The effect of different dietary ratios of lysine, arginine and methionine on biochemical parameters and hormone secretion in turkeys. <i>J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.</i> 2021, 105, 108-118. DOI: 10.1111/jpn.13433	2,718	100
1.1.8	Jankowski J., Ognik K., Całyniuk Z., Stępniewska A. , Konieczka P., Mikulski D. The effect of different dietary ratios of lysine,	3,730	200

	arginine and methionine on protein nitration and oxidation reactions in turkey tissues and DNA. <i>Animal</i> 2021, 15, 100183. DOI: 10.1016/j.animal.2021.100183		
1.1.9	Ognik K., Mikulski D., Konieczka P., Tykałowski B., Krauze M., Stępniewska A., Nynca A., Jankowski J. The immune status, oxidative and epigenetic changes in tissues of turkeys fed diets with different ratios of arginine and lysine. <i>Sci. Rep.</i> 2021, 11, 15975. DOI: 10.1038/s41598-021-95529-y	4,996	140
1.1.10	Ognik K., Kozłowski K., Stępniewska A. , Listos P., Józefiak D., Zduńczyk Z., Jankowski J. Antioxidant status and liver function of young turkeys receiving a diet with full-fat insect meal from <i>Hermetia illucens</i> . <i>Animals</i> 2020, 10, 1339. DOI: 10.3390/ani10081339	2,752	100
1.1.11	Ognik K., Konieczka P., Stępniewska A. , Jankowski J. Oxidative and epigenetic changes and gut permeability response in early-treated chickens with antibiotic or probiotic. <i>Animals</i> 2020, 10, 2204. DOI: 10.3390/ani10122204	2,752	100
1.1.12	Stępniewska A. , Czech A., Sujak A., Matusevicius P., Chałabis-Mazurek A. The effect of pumpkin varieties on the content of selected toxic elements from south-eastern Poland. <i>J. Food Compos. Anal.</i> 2020, 92, 103632. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103632	4,556	100
1.1.13	Jankowski J., Ognik K., Kozłowski K., Stępniewska A. , Zduńczyk Z. Effect of different levels and sources of dietary copper, zinc and manganese on the performance and immune and redox status of Turkeys. <i>Animals</i> 2019, 9, 883. DOI: 10.3390/ani9110883	2,323	100
1.1.14	Stępniewska A. , Sztanke M., Tuzimski T., Korolczuk M., Sztanke K. Square-wave adsorptive stripping voltammetric approaches at two in situ modified electrodes as first analytical methods for the quantitative determination of a new anticancer drug candidate. <i>J. Iran. Chem. Soc.</i> 2019, 16, 2755-2763. DOI: 10.1007/s13738-019-01735-x	1,552	40
1.1.15	Ognik K., Cholewińska E., Stępniewska A. , Drażbo A., Kozłowski K., Jankowski J. The effect of administration of copper nanoparticles in drinking water on redox reactions in the liver and breast muscle of broiler chickens. <i>Ann. Anim. Sci.</i> 2019, 19, 663-677. DOI: 10.2478/aoas-2019-0009	1,572	140
1.1.16	Chachaj R., Sembratowicz I., Krauze M., Stępniewska A. , Rusinek-Prystupa E., Czech A., Matusevicius P., Ognik K. The effect of fermented soybean meal on performance, biochemical and immunological blood parameters in turkeys. <i>Ann. Anim. Sci.</i> 2019, 19, 1035-1049. DOI: 10.2478/aoas-2019-0040	1,572	140
1.1.17	Ognik K., Kozłowski K., Stępniewska A. , Szlązak R., Tutaj K., Zduńczyk Z., Jankowski J. The effect of manganese nanoparticles on performance, redox reactions and epigenetic changes in turkey tissues. <i>Animal</i> 2019, 13, 1137-1144. DOI:10.1017/S1751731118002653	2,400	200
1.1.18	Jankowski J., Ognik K., Stępniewska A. , Zduńczyk Z.,	2,659	140

	Kozłowski K. The effect of the source and dose of manganese on the performance, digestibility and distribution of selected minerals, redox, and immune status of turkeys. <i>Poult. Sci.</i> 2019, 98, 1379-1389. DOI: 10.3382/ps/pey467		
1.1.19	Kulak E., Ognik K., Stępniewska A. , Drażbo A. Effect of nanoparticles of silver on redox status and the accumulation of Ag in chicken tissues. <i>J. Sci. Food Agric.</i> 2018, 98, 4085-4096. DOI: 10.1002/jsfa.8925	2,422	35
1.1.20	Czech A., Ognik K., Laszewska M., Cholewińska E., Stępniewska A. Modification of the lipid profile and antioxidant status of the blood plasma of turkey hens fed mixtures with raw or extruded linseed. <i>J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.</i> 2018, 102, e270-e278. DOI: 10.1111/jpn.12738	1,703	30
1.1.21	Perez-Esteve E., Sałata A., Barat J.M., Stępniewska A. , Lopez Galarza S., Nurzyńska-Wierdak R. Polyphenolic composition of spanish cultivars of globe artichoke (<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>Scolymus</i> (L.) Fiori). <i>Acta Sci Pol. Hortorum Cultus</i> 2018, 17, 177-184. DOI: 10.24326/asphc.2018.2.15	0,443	20
1.1.22	Brodacki A., Batkowska J., Stępniewska A. , Blicharska E., Drabik K. Quality and mineral composition of eggs from hens supplemented with copper-lysine chelate. <i>Arch. Anim. Breed. - Arch. Tierz.</i> 2018, 61, 109-113. DOI: 10.5194/aab-61-109-2018	1,157	20
1.1.23	Woźniak A., Rachoń L., Stępniewska A. Spring wheat grain quality in relation to a cropping system. <i>J. Elem.</i> 2018, 23, 1295-1306. DOI: 10.5601/jelem.2018.23.1.1580	0,733	15
1.1.24	Czech A., Stępniewska A., Wiącek D., Sujak A., Grela E.R. The content of selected nutrients and minerals in some cultivars of <i>Cucurbita maxima</i> . <i>Br. Food J.</i> 2018, 120, 2261-2269. DOI: 10.1108/BFJ-10-2017-0599	1,717	25
1.1.25	Kulak E., Ognik K., Stępniewska A. , Sembratowicz I. The effect of administration of silver nanoparticles on silver accumulation in tissues and the immune and antioxidant status of chickens. <i>J. Anim. Feed Sci.</i> 2018, 27, 44-54. DOI: 10.22358/jafs/84978/2018	0,875	20
1.1.26	Kulak E., Sembratowicz I., Stępniewska A. , Ognik K. The effect of administration of silver nanoparticles on the immune status of chickens. <i>Ann. Anim. Sci.</i> 2018, 18, 401-416. DOI: 10.1515/aoas-2017-0043	1,515	20
1.1.27	Jankowski J., Ognik K., Stępniewska A. , Zduńczyk Z., Kozłowski K. The effect of manganese nanoparticles on apoptosis and on redox and immune status in the tissues of young turkeys. <i>PloS One</i> 2018, 13, e0201487. DOI: 10.1371/journal.pone.0201487	2,776	40
1.1.28	Stępniewska A., Sztanke M., Tuzimski T., Korolczuk M., Sztanke K. A simple stripping voltammetric method for the determination of a new anticancer prodrug in serum. <i>Biosens. Bioelectron.</i> 2017, 94, 584-588. DOI: 10.1016/j.bios.2017.03.053	8,173	40
1.1.29	Ognik K., Sembratowicz I., Czech A., Stępniewska A. , Cholewińska E. Effect of aloe preparation and 5-oxo-1,2,4-triazine on mineral composition of tissues of turkey hens	0,826	15

	subjected to stress. <i>J. Appl. Anim. Res.</i> 2017, 45, 460-463. DOI: 10.1080/09712119.2016.1211529		
1.1.30	Ognik K., Stępniewska A. , Kozłowski K. The effect of administration of silver nanoparticles to broiler chickens on estimated intestinal absorption of iron, calcium, and potassium. <i>Livest. Sci.</i> 2017, 200, 40-45. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.04.002	1,204	35
1.1.31	Woźniak A., Stępniewska A. Yield and quality of durum wheat grain in different tillage systems. <i>J. Elem.</i> 2017, 22, 817-829. DOI: 10.5601/jelem.2016.21.4.1304	0,684	15
1.1.32	Sembratowicz I., Ognik K., Stępniewska A. An evaluation of in vitro intestinal absorption of iron, calcium and potassium in chickens receiving gold nanoparticles. <i>Br. Poult. Sci.</i> 2016, 57, 559-565. DOI: 10.1080/00071668.2016.1187713	0,884	30
1.1.33	Woźniak A., Nowakowicz-Dębek B., Stępniewska A. , Wlazło Ł. Effect of ozonation on microbiological and chemical traits of wheat grain. <i>Plant, Soil Environ.</i> 2016, 62, 552-557. DOI: 10.17221/655/2015-PSE	1,225	25
1.1.34	Ognik K., Stępniewska A. , Cholewińska E., Kozłowski K. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in drinking water on estimated intestinal absorption of iron, zinc, and calcium. <i>Poult. Sci.</i> 2016, 95, 2045-2051. DOI: 10.3382/ps/pew200	1,908	35
1.1.35	Stępniewska A. , Czech A., Malik A., Chałabis-Mazurek A., Ognik K. The influence of winemaking on the content of natural antioxidants and mineral elements in wines made from berry fruits. <i>J. Elem.</i> 2016, 21, 871-880. DOI: 10.5601/jelem.2015.20.4.1020	0,641	15
1.1.36	Czech A., Ognik K., Klebaniuk R., Stępniewska A. Chemical characteristic of the feed mixtures containing raw and extruded flax seeds. <i>Przem. Chem.</i> 2015, 94, 960-966. DOI: 10.15199/62.2015.6.20	0,367	15
1.1.37	Woźniak A., Soroka M., Stępniewska A. , Makarski B. Chemical composition of pea (<i>Pisum sativum</i> L.) seeds depending on tillage systems. <i>J. Elem.</i> 2014, 19, 1143-1152. DOI:10.5601/jelem.2014.19.3.484	0,690	15
1.1.38	Woźniak A., Soroka M., Stępniewska A. , Makarski B. Chemical composition of spring barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) grain cultivated in various tillage systems. <i>J. Elem.</i> 2014, 19, 597-606. DOI: 10.5601/jelem.2014.19.2.438	0,690	15
1.1.39	Woźniak A., Makarski B., Stępniewska A. Effect of tillage system and previous crop on grain yield, grain quality and weed infestation of durum wheat. <i>Rom. Agric. Res.</i> 2014, 31, 129-137.	0,281	15
PRACE WYDANE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA			
1.1.40	Korolczuk M., Stępniewska A. Determination of Cr(VI) in the presence of high excess of a Cr(III) by adsorptive stripping voltammetry. <i>Talanta</i> , 2012, 88, 427-431. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.11.012	3,498	40

1.1.41	Korolczuk M., Stępniewska A. Stripping Voltammetric Determination of Methylmercury in the Presence of Inorganic Mercury. <i>Electroanal.</i> 2010, 22, 2087-2091. DOI:10.1002/elan.201000073	2,721	32
1.1.42	Korolczuk M., Stępniewska A. , Tyszczyk K. Determination of cadmium by stripping voltammetry at a lead film electrode. <i>Int. J. Environ. Anal. Chem.</i> 2009, 8-12, 727-734. DOI: 10.1080/03067310802562683	1.703	15
Razem		95,302	2922

1.2. Prace oryginalne w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

Lp.	PRACE WYDANE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	MEiN
1.2.1	Ognik K., Sembratowicz I., Stępniewska A. , Cholewińska E., Krauze M. Effect of aloe preparation and 5-oxo-1,2,4-triazine on the effects of performance and chemical composition of tissues of turkey hens subjected to stress. <i>Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, EE Zootech.</i> 2015, 33, 29-41.	7
Razem		7

1.3. Prace przeglądowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

Lp.	PRACE WYDANE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	MEiN
1.3.1	Stępniewska A. , Ciepłńska P., Fac W., Górska J. Selected alkaloids used in the cosmetics industry. <i>J. Cosmet. Sci.</i> 2021, 72, 229-245.	20
1.3.2	Stępniewska A. , Kowalczyk M., Cholewińska E., Ognik K. E-papierosy – pomoc w rzuceniu palenia czy zagrożenie? <i>Hygeia</i> 2017, 52, 86-95.	8
Razem		28

Bibliometryczne podsumowanie publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego wymienionych w punkcie II.1

Łącznie - IF: 95,302; Punkty MEiN: 2957

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

2.1. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

Lp.	PRACE WYDANE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	MEiN
2.1.1.	Stępniewska A. Biosurfaktanty w kosmetykach. W: Wybrane aspekty biokosmetologii. Pod red. M. Chwil i B. Denisow, Lublin, 2021, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 141-150.	20
2.1.2	Stępniewski D., Wodyk T., Wojewoda A., Cholewińska E., Ognik K., Stępniewska A. Możliwość wykorzystania analizy witaminy C oraz kwasu moczowego w diagnostyce zdrowia drobiu. W: Aktualne problemy w produkcji zwierzęcej. Pod red. W. Chabuza, B. i Nowakowicz-Dębek, Lublin, 2018, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 102-108.	20
2.1.3	Cholewińska E., Stępniewski D., Wodyk T., Wojewoda A., Ognik K., Stępniewska A. , Bryś M. Prozdrowotne właściwości czystka (Pro-health properties of Cistus). W: Żywność i żywienie. Pod red. J. Nyckowiak i J. Leśny, Poznań, 2018, Młodzi Naukowcy, s. 26-30.	5
2.1.4	Wodyk T., Stępniewski D., Wojewoda A., Cholewińska E., Ognik K., Stępniewska A. Wykorzystanie dialdehydu malonowego oraz nadtlenków lipidowych jako wskaźników w diagnostyce zdrowia drobiu. W: Aktualne problemy w produkcji zwierzęcej. Pod red. W. Chabuza i B. Nowakowicz-Dębek, Lublin, 2018, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 109-115.	20
2.1.5	Stępniewska A. , Wojewoda A., Wodyk T. Alkohol etylowy – wybrane aspekty toksykologiczne i analityczne. W: Najnowsze doniesienia z zakresu nauk ścisłych. Pod red. M. Szala i K. Maciąg, Lublin, 2017, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, s. 166-179.	20
2.1.6	Kłys S., Czech A., Stępniewska A. Niebezpieczeństwa związane z promieniowaniem ultrafioletowym w środowisku pracy. W: Ergonomia, bezpieczeństwo i higiena pracy w praktyce t. 2. Pod red. H. Pawlak i B. Nowakowicz-Dębek, Lublin, 2017, Towarzystwo Wydawnictw Naukowych Libropolis, s. 165-179.	5
2.1.7	Stępniewska A. , Ognik K., Cholewińska E. Ocena narażenia zawodowego na pyły w rolnictwie. W: Ergonomia, bezpieczeństwo i higiena pracy w praktyce t. 2. Pod red. H. Pawlak i B. Nowakowicz-Dębek, Lublin, 2017, Towarzystwo Wydawnictw Naukowych Libropolis, s. 297-310.	5
2.1.8	Stępniewska A. , Ognik K., Rusinek-Prystupa E., Czech A., Cholewińska E. Ftalany jako zagrożenie dla zdrowia pracowników. W: Ergonomia, bezpieczeństwo i higiena pracy w praktyce. Pod red. B. Nowakowicz-Dębek i H. Pawlak, Lublin, 2016, Towarzystwo Wydawnictw Naukowych Libropolis, s. 115-123.	5
2.1.9	Cholewińska E., Ognik K., Stępniewska A. , Cisek A., Kosuń J. Postępowanie techniczno-kryminalistyczne i sędowo-lekarskie w przypadku zgonu z podejrzeniem o zatrucie. W: Kryminalistyka w ujęciu naukowym. Pod red. B. Zdunek i K. Maciąg, Lublin, 2016, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, s. 100-117.	5
2.1.10	Stępniewska A. , Kiesz M., Zasadna Z., Cholewińska E., Czech A. Profil kwasów tłuszczowych w tkankach karpia i śledzia. W: Przegląd wybranych	5

	zagadnień z zakresu przemysłu spożywczego. Pod red. M. Szala i K. Kropiwiec, Lublin, 2016, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, s. 114-122.	
2.1.11	Krauze M., Stępniewska A. , Abramowicz K. Śmiercionośne oblicze „Krokodyla”. W: Kryminalistyka w ujęciu naukowym. Pod red. B. Zdunek i K. Maciąg, Lublin, 2016, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, s. 146-155.	5
2.1.12	Rusinek-Prystupa E., Abramowicz K., Czech A., Stępniewska A. , Ognik K. Wiedza rolników w zakresie chorób układu oddechowego związanych z chemicznymi zanieczyszczeniami środowiska pracy. W: Ergonomia, bezpieczeństwo i higiena pracy w praktyce. Pod red. B. Nowakowicz-Dębek i H. Pawlak, Lublin, 2016, Towarzystwo Wydawnictw Naukowych Libropolis, s. 211-222.	5
2.1.13	Cholewińska E., Ognik K., Stępniewska A. Zatrucia grzybami - objawy, diagnostyka, leczenie. W: Rośliny - przegląd wybranych zagadnień. Pod red. K. Kropiwiec i M. Szala, Lublin, 2016, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, s. 335-348.	5
2.1.14	Stępniewska A., Golian S. Aspartam as a factor of food product quality (Aspartam a jakość produktów spożywczych). W: Promotion of healthy lifestyle in european countries = Promocja zdrowego stylu życia w krajach europejskich. Pod red. B. Sawicki, Lublin, 2016, Katedra Turystyki i Rekreacji Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 539-551.	5
Razem		130

Bibliometryczne podsumowanie opracowań przedstawionych w punkcie II.2

Łącznie - Punkty MEiN: 130

3. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Lp.	Doniesienie
3.1.	Stępniewska A. , Tutaj K., Sołek P., Fotschki B., Juśkiewicz J., Matusевич P., Ognik K. The effect of a low or high-fat diet and supplementation with various forms of chromium on immunological parameters in the rat's organism. Livestock Production – Recent Trends and Future Prospects, Lithuanian University of Life Sciences, Kowno, Litwa, 16.11.2022
3.2.	Jurczak P., Krauze M., Stępniewska A. , Tutaj K., Ognik K., Jankowski J. Ocena zmian neurodegeneracyjnych u indyków żywionych dietami o różnych proporcjach argininy i metioniny w stosunku do lizyny (Assessment of neurodegenerative changes in turkeys fed diets with different proportions of arginine and methionine relative to lysine). XXXII Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PB WPSA „Nauka praktyce – praktyka nauce”, Lidzbark Warmiński, 5–7.09.2022
3.3.	Smagiel R., Cholewińska E., Marzec A., Sembratowicz I., Ognik K., Stępniewska A., Mikulski D., Szymański Ł., Jankowski J. Wpływ wczesnego podawania antybiotyków lub żywienia dietą zawierającą kokcydiostatyk na status oksydoredukcyjny krwi

-
- indyków (Effect of early administration of antibiotics or feeding a diet containing a coccidiostat on the redox status of turkey blood). XXXII Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PB WPSA „Nauka praktyce – praktyka nauce”, Lidzbark Warmiński, 5–7.09.2022
-
- 3.4. Smagiel R., Tutaj K., Osowska P., Marzec M., **Stępniewska A.**, Józwiakowski K., Ognik K. Ocena toksykologiczna ścieków z hybrydowej hydrofitowej oczyszczalni przy ośrodku dydaktyczno-muzealnym Poleskiego Parku Narodowego. VIII Konferencja Naukowo-Techniczna: Nowe kierunki badań w inżynierii środowiska, energetyce i geodezji, połączona z obchodami Jubileuszu 60-lecia pracy naukowej prof. dra hab. inż. Oleksandra Dorozhynskyy'ego, Urszulin, 21-23.09.2022
-
- 3.5. Sembratowicz I., Krauze M., Czech A., **Stępniewska A.**, Szczepańska D. Wpływ ultradźwięków na stężenie substancji polifenolowych w wyciągach z ziół stosowanych w kosmetyce. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022
-
- 3.6. Czech A., Ognik K., Tutaj K., **Stępniewska A.**, Sembratowicz I. Owoce jagodowe, jako źródło substancji antyoksydacyjnych wykorzystywanych w produktach kosmetycznych. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022
-
- 3.7. Czech A., Sembratowicz I., **Stępniewska A.**, Krauze M., Cholewińska E. Owoce cytrusowe, jako źródło substancji antyoksydacyjnych wykorzystywanych w produktach kosmetycznych. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022
-
- 3.8. Sembratowicz I., Czech A., Krauze M., **Stępniewska A.**, Wawryniuk K. Zawartość antocyjanów i karotenoidów w wybranych surowcach zielarskich stosowanych w kosmetologii. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022
-
- 3.9. Ognik K., **Stępniewska A.**, Krauze M., Tutaj K., Sembratowicz I., Witek J. Ocena zawartości rutyny w kremach kosmetycznych wytworzonych z dodatkiem ziół. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022
-
- 3.10. Cholewińska E., **Stępniewska A.**, Ognik K., Sembratowicz I., Czech A., Gruszczyk W. Potencjał antyoksydacyjny toników kosmetycznych wytwarzanych z dodatkiem ekstraktów z rozmarynu, czystka i tymianku. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022
-
- 3.11. **Stępniewska A.**, Krauze M., Cholewińska E., Czech A., Tutaj K., Ciepłińska P. Analiza związków polifenolowych w kremach kosmetycznych wytwarzanych z dodatkiem ekstraktów z owoców jagodowych. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin, 15–16.11.2022,
-
- 3.12. Cholewińska E., Mikulski M., Krauze M., **Stępniewska A.**, Matusевич P., Ognik K., Jankowski J. The effect of diets with different ratios of arginine and lysine on immune status, oxidative and epigenetic changes in tissues of turkeys. Recent Trends and Future Prospects in Livestock Production, Lithuanian University of Life Sciences, Kowno, Litwa, 11.11.2021
-
- 3.13. **Stępniewska A.**, Cholewińska E., Krauze M., Matusевич P., Fotschki B., Juśkiewicz J., Ognik K.. Effect of a high-fat diet and chromium on hormones level and Cr retention in rats. Recent Trends and Future Prospects in Livestock Production, Lithuanian University of Life Sciences, Kowno, Litwa, 11.11.2021
-
- 3.14. Ciepłińska P., Całyński Z., Cholewińska E., Jurczak P., Kiewlak M., **Stępniewska A.** Wpływ formy i dawki chromu na poziom wybranych neuroprzekazników w
-

-
- organizmie kurcząt (The effect of form and dose of chromium on the level of selected neurotransmitters in the organism of chickens). Przegląd badań prowadzonych w studenckich kołach naukowych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. Lublin, 2020
-
- 3.15. Konieczka P., Mikulski D., Ognik K., **Stępniewska A.**, Jankowski J. Different dietary ratios of arginine, methionine and lysine affect DNA integrity in the gut tissue of turkeys challenged with *C. Perfringens*. XLVIII Sesja Naukowa Sekcji Żywienia Zwierząt Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk, Poznań, 13-14.06.2019
-
- 3.16. **Stępniewska A.**, Rusinek-Prystupa E., Kozłowski K., Tutaj K., Drażbo A., Krauze M. Wpływ dodatku nanocząstek chromu i pikolinianu chromu do diety kurcząt na obraz histologiczny wątroby oraz status oksydoredukcyjny wybranych tkanek (The effect of the addition of chromium nanoparticles and chromium picolinate on the chicken diet on the histological picture of the liver and the redox status of selected tissues). XXXI Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PB WPSA „Nauka praktyce – praktyka nauce”, Polańczyk, 04-06.09.2019
-
- 3.17. **Stępniewska A.**, Kozłowski K., Ognik K., Czech A., Drażbo A., Jankowski J. Wpływ dodatku nanocząstek chromu i pikolinianu chromu do diety kurcząt na wyniki odchowu oraz poziom wybranych hormonów (The effect of the addition of chromium nanoparticles and chromium picolinate to the chicken diet on the performance and level of selected hormones). XXXI Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PB WPSA „Nauka praktyce – praktyka nauce”, Polańczyk, 04-06.09.2019
-
- 3.18. Wojewoda A., Wodyk T., Stępniewski D., Cholewińska E., **Stępniewska A.**, Ognik K. Analiza zawartości substancji biologicznie aktywnych w kiełkach różnych gatunków roślin jadalnych = Analysis of the content of biologically active substances in sprouts of various edible plant species. Ogólnopolska Konferencja Naukowa: Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych. Lublin, 2018
-
- 3.19. Stępniewski D., Wodyk T., Wojewoda A., Cholewińska E., Ognik K., **Stępniewska A.** Możliwość wykorzystania witaminy C i kwasu moczowego w diagnostyce zdrowia drobiu. XV Międzynarodowe Seminarium Studenckich Kół Naukowych nt. "Środowisko - Zwierzę - Produkt": V Konferencja Doktorantów, Lublin, 17.04.2018
-
- 3.20. Cholewińska E., Ognik K., **Stępniewska A.**, Drażbo A. The effect of using fermented protein products in turkey feed on the redox status of the blood (Wpływ stosowania fermentowanych produktów białkowych w żywieniu indyków na status redox krwi). XXX Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PB WPSA „Nauka praktyce – praktyka nauce”, Zegrze, 10-12.09.2018
-
- 3.21. Wodyk T., Stępniewski D., Wojewoda A., Cholewińska E., Ognik K., **Stępniewska A.** Wykorzystanie dialdehydu malonowego oraz nadtlenków lipidowych jako wskaźników w diagnostyce zdrowia drobiu. XV Międzynarodowe Seminarium Studenckich Kół Naukowych nt. "Środowisko - Zwierzę - Produkt": V Konferencja Doktorantów, Lublin, 17.04.2018
-
- 3.22. Wojewoda A., Stępniewski D., Wodyk T., Cholewińska E., **Stępniewska A.** Analiza zawartości stewiozydów jako związków biologicznie aktywnych w stewii (*Stevia rebaudiana*) oraz produktach wytwarzanych na bazie tej rośliny. International Conference of Natural and Medical Science: Young Scientists, PhD Students and Students, Lublin, 1-3.12.2017
-
- 3.23. Czech A., Krauze M., Abramowicz K., **Stępniewska A.** Blood hematologic profile of chickens receiving cinnamon oil in the water = Obraz hematologiczny krwi kurcząt otrzymujących w wodzie dodatek olejku cytrynowego. XXIX Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PO WP SA „Nauka praktyce - praktyka nauce”, Tarnowo Podgórne, 18-20.09.2017
-

-
- 3.24. Ognik K., Cholewińska E., Otowski K., Kozłowski K., Jankowski J., **Stępniewska A.** Effect of application of different forms and dosages of Mn in turkey diet on indicators of protein oxidation and nitration = Wpływ stosowania różnych form i dawek Mn w diecie indyków na wskaźniki oksydacji i nitrowania białek. XXIX Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PO WP SA „Nauka praktyce - praktyka nauce”, Tarnowo Podgórze, 18-20.09.2017
-
- 3.25. **Stępniewska A.**, Cholewińska E., Ognik K., Otowski K., Kozłowski K., Jankowski J., Zduńczyk Z. Effect of using different forms and dosages of Mn in turkey diet on indicators of redox status = Wpływ stosowania różnych form i dawek Mn w diecie indyków na wskaźniki statusu oksydoredukcyjnego. XXIX Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PO WP SA „Nauka praktyce - praktyka nauce”, Tarnowo Podgórze, 18-20.09.2017
-
- 3.26. **Stępniewska A.**, Wojewoda A., Wodyk T. E-papierosy – pomoc w rzuceniu palenia czy zagrożenie?. IX Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2017: Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju, Lublin, 18-19.03.2017
-
- 3.27. Kiesz M., Czech A., Chachaj R., **Stępniewska A.**, Wlazło Ł. Obraz mikrobiologiczny i histologiczny przewodu pokarmowego oraz wybrane wskaźniki krwi prosiąt otrzymujących fermentowaną śrutę sojową lub rzepakową = Microbiological and histological profile of the gastrointestinal tract and selected blood parameters in piglets receiving fermented soybean or rapeseed meal. XLVI Sesja Naukowa Sekcji Żywnienia Zwierząt Komitet Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polska Akademia Nauk, Lublin, 21-23.06.2017
-
- 3.28. **Stępniewska A.**, Ognik K., Śmiech A., Cholewińska E., Stępniewski D., Wodyk T., Wojewoda A. Porównanie zawartości karotenów w różnych odmianach dyni jadalnych. XX Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna: Pierwiastki - Środowisko - Zdrowie, Lublin, 27.05.2017.
-
- 3.29. Cholewińska E., Ognik K., **Stępniewska A.** The effect of administration of copper nanoparticles to chickens on content of copper, zinc and iron in breast muscle and liver. XX Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna: Pierwiastki - Środowisko - Zdrowie, Lublin, 27.05.2017
-
- 3.30. **Stępniewska A.**, Chachaj R., Ognik K., Czech A. Wpływ diety z udziałem fermentowanych produktów białkowych na profil biochemiczny krwi indyków = The influence of diet with fermented protein products on the biochemical profile of blood of turkeys. XLVI Sesja Naukowa Sekcji Żywnienia Zwierząt Komitet Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polska Akademia Nauk, Lublin, 21-23.06.2017
-
- 3.31. Sałata A., Buczkowska H., Nurzyńska-Wierdak R., Lopez Galarza S.V., **Stępniewska A.** Pharmaceutical compounds in leaves and floral stem of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. Var. *Scolymus* (L.) Fiori). VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016", Jahorina, East Sarajevo, 6-9.10.2016
-
- 3.32. Ognik K., **Stępniewska A.**, Cholewińska E. Wpływ stosowania fermentowanej śruty sojowej lub rzepakowej w mieszankach paszowych dla kurcząt na dostępność oraz stopień bioretencji fosforu, wapnia i magnezu w tkankach = The effect of including fermented soybean or rapeseed meal in compounded feed for chickens on the availability and bioretention of phosphorus, calcium and magnesium in tissues. XLV Sesja Naukowa Sekcji Żywnienia Zwierząt Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn, 21-22.06.2016
-
- 3.33. **Stępniewska A.**, Cholewińska E., Oksejuk P., Szabelak A., Czech A. Content of heavy metals in single-flower honeys from Ukraine. XVIII Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna: Rola pierwiastków w biosferze, Lublin, 30.05.2015
-
- 3.34. **Stępniewska A.**, Cholewińska E., Oksejuk P., Szabelak A., Czech A. Content of

-
- microelements in single-flower honeys from Ukraine. XVIII Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna: Rola pierwiastków w biosferze, Lublin, 30.05.2015
-
- 3.35. **Stępniewska A.**, Merska-Kazanowska M., Oksejuk P., Szabelak A., Czech A. Contents of bioactive substances in forest fruits and processed products. Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna: Rola pierwiastków w biosferze, Lublin, 30.05.2015
-
- 3.36. Sałata A., Lopez Galarza S.V., **Stępniewska A.** Phenolic composition of different morphological parts of *Cynara scolymus* L. International Scientific Conference. Horticulture in shaping life quality, Lublin, 18-19.06.2015
-
- 3.37. Cholewińska E., **Stępniewska A.**, Ognik K. Postępowanie techniczno-kryminalistyczne i sędowo-lekarskie w przypadku zgonu podejrzanego o zatrucie = Forensic procedure in cases of death from suspected poisoning. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Krimed: Metody badawcze w kryminalistyce i medycynie sądowej, Lublin, 2015
-
- 3.38. Krauze M., **Stępniewska A.**, Abramowicz K. Śmiercionośne oblicze "Krokodyla" = Deadly nature of "Crocodile". I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Krimed: Metody badawcze w kryminalistyce i medycynie sądowej, Lublin, 2015
-
- 3.39. Lechowski J., **Stępniewska A.**, Makarska E., Makarski B., Nowak M. Ocena efektywności resorpcji miedzi w warunkach 'in vitro' w jelicie czczym *Sus Scrofa* F. Dometicus'. Pierwiastki chemiczne, a jakość życia: XVII Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 31.05.2014
-
- 3.40. Woźniak A., **Stępniewska A.**, Makarski B. Skład chemiczny nasion grochu siewnego (*Pisum Sativum* L.) w zależności od systemu uprawy roli. Pierwiastki chemiczne, a jakość życia: XVII Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 31.05.2014
-
- 3.41. Lechowski J., **Stępniewska A.**, Nowak M., Makarski B. Badanie resorpcji miedzi w warunkach in vitro. Pierwiastki chemiczne a zdrowie: XVI Naukowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 25.05.2013, Lublin
-
- 3.42. Gryzińska M., Krauze M., Merska M., **Stępniewska A.**, Kubaczyński A. Concentration of calcium, sodium, potassium and magnesium in blood serum of hens. Pierwiastki chemiczne a zdrowie: XVI Naukowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 25.05.2013
-
- 3.43. Krauze M., **Stępniewska A.**, Gryzińska M., Merska M., Kubaczyński A. Content of chosen elements in infusions of coffee and assesment of their daily intake. Pierwiastki chemiczne a zdrowie: XVI Naukowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 25.05.2013
-
- 3.44. Rusinek-Prystupa E., **Stępniewska A.** Determination of tannins and soluble oxalates in chosen tea and coffee. Pierwiastki chemiczne a zdrowie: XVI Naukowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 25.05.2013
-
- 3.45. Merska M., Krauze M., **Stępniewska A.**, Gryzińska M., Kubaczyński A. The influence of caffeine on selected antioxidant indices and concentration of antioxidative microelements of turkey hens' blood. Pierwiastki chemiczne a zdrowie: XVI Naukowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 25.05.2013
-
- 3.46. Woźniak A., **Stępniewska A.**, Makarski B. Zawartość składników mineralnych i fosforu fitynowego w ziarnie pszenicy. W: Pierwiastki chemiczne a zdrowie: XVI Naukowa Konferencja Magnezologiczna, Lublin, 25.05.2013
-

4. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

Lp.	Konferencja	Termin
4.1	1st International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT- PLANT-ANIMAL-PRODUCT (ICDSUPL) – członek komitetu organizacyjnego	26.04.2022
4.2	III Ogólnopolska Konferencja Naukowa Toksyny – przegląd i badania – członek komitetu naukowego	04.04.2022
4.3	VI FORUM MŁODYCH PRZYRODNIKÓW Rolnictwo. Żywność. Zdrowie – członek komitetu naukowego	25.05.2019

5. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

Lp.	Projekt	Realizacja	Charakter udziału
5.1	NCN MINIATURA 017/01/X/ST4/01784 „Zastosowanie analizy stripingowej do oznaczania amin biogennych”	2018-2019 zrealizowany	kierownik
5.2	NCN OPUS 2017/27/B/NZ9/01007 „Antyoksydacyjne i immunostymulujące oddziaływanie zróżnicowanych poziomów i wzajemnego stosunku lizyny, argininy i metioniny w mieszankach dla indyków rzeźnych”	2017-2021 zrealizowany	wykonawca
5.3	NCN OPUS 20 2020/39/B/NZ9/00674 „Łagodzenie niekorzystnych efektów związanych ze spożywaniem diety wysokotłuszczowej poprzez zmianę sposobu żywienia i/lub suplementację różnymi formami chromu”	2021- w trakcie realizacji	wykonawca
5.4	NCN OPUS 20 2020/39/B/NZ9/00765 „Odpowiedź układu immunologicznego i systemu oksydoredukcyjnego indyków żywionych dietami z lub bez dodatku kocydiostatyku na wczesne podanie antybiotyków”	2021- w trakcie realizacji	wykonawca

6. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

Członek stowarzyszenia drobiarskiego The Polish Branch of World Poultry Science Association od 2020 roku

7. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

Lp.	Ośrodek badawczy	Czas pobytu
7.1	Litwa, Faculty of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy – Erasmus+	17.06.2019 – 21.06.2019
7.2	Litwa, Faculty of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy – staż naukowy	28.06.2019 – 29.09.2019
7.3	Litwa, Faculty of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy – Erasmus+	30.05.2022 – 03.06.2022
7.4	Litwa, Faculty of Animal Science of the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy – Erasmus+	14.11.2022 – 18.11.2022

8. Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

Rada naukowa czasopisma naukowego „Nauki Przyrodnicze i Medyczne” (ENG: Journal of Life and Medical Sciences) nr ISSN 2353-13-71 od 2013 roku

9. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

Lp.	Czasopismo	Liczba recenzji
1.	Veterinary Sciences	1
2.	BMC Veterinary Research	1
3.	International Journal of Nanomedicine	1
4.	Agriculture	1
5.	Scientific Reports	1
6.	Animals	5
7.	PLOS ONE	1
8.	Plants	1
9.	Phytotherapy Research	1
10.	Molecules	2

11.	International Journal of Vegetable Science	1
12.	Environmental Research	1
13.	Antioxidants	1
14.	Foods	1

III. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

1. Informacja o punktacji Impact Factor

Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), obejmujący publikacje z cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2B ustawy oraz pozostałe publikacje przedstawione w punkcie II.1.1, obliczony zgodnie z rokiem opublikowania na dzień 06.03.2023 r. wynosi: **112,744**

2. Liczba cytowań publikacji (na dzień 20.03.2023)

Liczba cytowań według bazy Web of Science (core collection) wynosi - **333**, bez autocytowań – **297**

Liczba cytowań według bazy Scopus wynosi - **352**, bez autocytowań - **316**

3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha

Indeks Hirsha według bazy Web of Science wynosi - 10

Indeks Hirsha według bazy Scopus wynosi - 10

4. Informacja o liczbie punktów MEiN

Suma punktów MEiN, obejmująca publikacje z cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2B ustawy oraz pozostałe publikacje przedstawione w punkcie II, obliczony zgodnie z rokiem opublikowania na dzień 15.02.2023 r. wynosi: **3687**

Lublin, 20.03.2023 r.



Effect of a high-fat diet and chromium on hormones level and Cr retention in rats

A. Stępniewska¹ · K. Tutaj¹ · J. Juśkiewicz² · K. Ognik¹

Received: 11 June 2021 / Accepted: 12 September 2021 / Published online: 22 September 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Aims The aim of the study was to determine how the administration of a high-fat diet supplemented with various forms of chromium to rats affects accumulation of this element in the tissues and levels of leptin, ghrelin, insulin, glucagon, serotonin, noradrenaline and histamine, as well as selected mineral elements.

Methods The experiment was conducted on 56 male Wistar rats, which were divided into 8 experimental groups. The rats received standard diet or high fat diet (HFD) with addition of 0.3 mg/kg body weight of chromium(III) picolinate (Cr-Pic), chromium(III)-methioninate (Cr-Met), or chromium nanoparticles (Cr-NP).

Results Chromium in organic forms was found to be better retained in the body of rats than Cr in nanoparticles form. However, Cr-Pic was the only form that increased the insulin level, which indicates its beneficial effect on carbohydrate metabolism. In blood plasma of rats fed a high-fat diet noted an increased level of serotonin and a reduced level of noradrenaline. The addition of Cr to the diet, irrespective of its form, also increased the serotonin level, which should be considered a beneficial effect. Rats fed a high-fat diet had an unfavourable reduction in the plasma concentrations of Ca, P, Mg and Zn. The reduction of P in the plasma induced by supplementation with Cr in the form of Cr-Pic or Cr-NP may exacerbate the adverse effect of a high-fat diet on the level of this element.

Conclusion A high-fat diet was shown to negatively affect the level of hormones regulating carbohydrate metabolism (increasing leptin levels and decreasing levels of ghrelin and insulin).

Keywords Chromium · Rat · Hormone · High-fat diet · Cr digestibility

Introduction

Diet, particularly a diet rich in fats, plays a key role in the development of civilization diseases such as diabetes, cardiovascular disease, and cancer [1]. Studies on animal models fed a high-fat diet (HFD) have shown many adverse metabolic changes, such as hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and glucose intolerance [2]. In addition, a long-term

HFD is associated with the risk of obesity. Obese animals have been shown to have increased levels of leptin, the hormone encoded by the obesity (*ob*) gene. In physiological conditions, the plasma leptin concentration is proportional to the amount of adipose tissue in the body, and thus concentrations of this hormone are higher in obese individuals than in those with normal body weight [3]. Leptin has many functions in the organism, it decreases appetite and increases energy consumption, thereby acting as a long-term regulator of body weight [3, 4]. The hyperleptinemia observed in obese humans and animals suggests that their organisms are not sensitive to endogenous leptin [5]. Ghrelin has the opposite effect on the organism to leptin. This hormone is secreted by the stomach and acts as a meal initiator. Ghrelin peripherally and centrally administered to rats increased food intake, induced weight gain, stimulated secretion of gastric juice, and improved gastric motility [6]. Olszanecka-Glinianowicz et al. [7], in a study in obese women, noted a reduction in fasting ghrelin secretion, as well as an increase

✉ A. Stępniewska
anna.stepniowska@up.lublin.pl

✉ J. Juśkiewicz
j.juskiewicz@pan.olsztyn.pl

¹ Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

² Division of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland

in its levels as a result of weight loss. A high-fat diet also causes impairment of insulin secretion, i.e. insulin resistance. Insulin increases expression of the *ob* gene, and thus the release of leptin from the adipocytes [8]. According to Posey et al. [9], diet-induced obesity involves the acquisition of functional resistance of the central nervous system (CNS) to insulin and leptin, which in turn leads to pathological body weight gain. Because insulin and leptin can use the same intracellular signalling pathways, neuronal resistance to these hormones may involve the same or similar mechanisms [10].

Energy homeostasis is also regulated by neurotransmitters such as serotonin (5-HT) and dopamine [11, 12]. Changes in eating behaviour in obese individuals are due to changes in serotonin and dopamine secretion [13, 14]. Increased serotonin levels cause a feeling of satiety and are conducive to a reduction in food intake. Research by Haleem and Khalid [15] showed that a high-fat diet reduces the level of 5-HT in the hypothalamus and increases levels of 5-HT and 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) in the hippocampus of rats. Both inhibition and stimulation of serotonin and dopamine secretion are associated with differences in feeding behaviour, stimuli to eat, and energy expenditure [16].

A high-fat diet also indirectly affects mineral metabolism by disturbing normal hormone secretion. Iron is important for glucose-stimulated insulin secretion, but excessive iron induces oxidative stress and increases apoptosis in pancreatic β cells. The mechanisms whereby excess iron contributes to type 2 diabetes (T2D) are not fully understood but most likely involve insulin resistance and impairment of the function of pancreatic β cells [17]. On the other hand zinc increases uptake of 5-HT in the corpus callosum, cingulate cortex, and raphe nucleus of the brain of rats [18].

The adverse effect of a high-fat diet on the organism can be neutralised by adding chromium to the diet [19]. This element is involved in glucose metabolism, in part as a component of glucose tolerance factor (GTF). Chromium activates insulin receptor and increases insulin-dependent glucose uptake into cells. Furthermore, Cr reduces the leptin level in the blood [20]. Thus, chromium is a popular dietary supplement in the treatment of type 2 diabetes and the promotion of weight loss [21]. The addition of Cr to the diet also increases secretion of neurotransmitters such as serotonin and noradrenalin [22].

Both absorption of Cr and its effects on the organism depend on its chemical form. Inorganic compounds of Cr(III) are poorly absorbed in the gastrointestinal tract, while the organic forms of Cr like chromium picolinate (Cr-Pic), chromium malate or complexes with various amino acids are much more easily digested [23, 24]. Not all organic forms of Cr are absorbed to the same degree. According to Anderson et al. [25], Cr in the form of amino acid complexes is better absorbed than Cr in the form of Cr-Pic. This means that

absorption of organic forms of Cr depends on the organic ligand. Cr nanoparticles are also becoming increasingly popular; this includes both metallic Cr nanoparticles and nanoparticles in the form of chemical compounds, such as nano-Cr-Pic. Owing to the small size of nanoparticles, Cr in nano-form may be more digestible than macro-forms. However, knowledge of both the absorption of Cr nanoparticles and their effects on the body is still inadequate. As different forms of Cr are absorbed in varying degrees, their effect on the body may vary as well. We hypothesised that the addition of chromium to a high-fat diet would reduce the negative effect of that diet on the secretion of hormones regulating carbohydrate metabolism and physiologically important neurotransmitters. It was additionally postulated that chromium in nanoparticle form will be more easily digestible and better retained in the body of rats than chromium in organic form, and thus the regulatory effect of this form of Cr on hormonal metabolism will be more efficient. The aim of the study was to determine how the administration of a high-fat diet supplemented with various forms of chromium to rats affects accumulation of this element in the tissues and levels of leptin, ghrelin, insulin, glucagon, serotonin, noradrenaline and histamine, as well as selected mineral elements.

Materials and methods

The present study is part of a larger experiment. Experimental design and other physiological results have been published in Ognik et al. [26], Dworzański et al. [27] and Dworzański et al. [28].

Animals and diets

The experiment was conducted on 56 male Wistar outbred rats (*Rattus norvegicus*, Cmdb:WI). The animals were used in compliance with the European guidelines for the care and use of animal models [29]. The Animal Care and Use Committee in Olsztyn (Poland) approved the experimental protocol (approval no. 04/2019). All efforts were made to minimise the suffering of the experimental animals. At the start of the experiment the rats weighed 131 ± 4.33 g and were randomly assigned to one of eight groups of seven rats each. The animals were kept individually in metabolic cages (Tecniplast Spa, Buguggiate, Italy) under a stable temperature (21–22 °C), a 12-h light:12-h dark cycle, and a ventilation rate of 20 air changes per hour. For 8 weeks the rats had free access to tap water and semi-purified diets, which were prepared and then stored at 4 °C in hermetic containers until the end of the experiment (Table 1). The diets were modifications of a casein diet for laboratory rodents recommended by the American Institute of Nutrition [30]. Two types of

Table 1 Composition of diets fed to rats, %

Ingredient	Diet	
	Standard	High-fat
Casein ^a	20.0	20.0
DL-methionine	0.3	0.3
Cellulose ^b	5.0	3.00
Sucrose	10.0	10.0
Rapeseed oil	8.0	8.0
Lard	–	17.0
Vitamin mixture ^c	1.0	1.0
Mineral mixture ^d	3.5	3.5
Choline chloride	0.2	0.2
Cholesterol	0.3	0.3
Corn starch ^f	51.7	36.7

^aCasein preparation (LACPOL Co., Murowana Goslina, Poland), crude protein 89.7%, crude fat 0.3%, ash 2.0%, water 8.0%

^b α -cellulose (SIGMA, Poznan, Poland), main source of dietary fibre

^cAIN-93G-VM (Reeves, 1997), g kg⁻¹ mix: 3.0 nicotinic acid, 1.6 Ca pantothenate, 0.7 pyridoxine-HCl, 0.6 thiamin-HCl, 0.6 riboflavin, 0.2 folic acid, 0.02 biotin, 2.5 vitamin B₁₂ (cyanocobalamin, 0.1% in mannitol), 15.0 vitamin E (all-rac- α -tocopheryl acetate, 500 IU g⁻¹), 0.8 vitamin A (all-*trans*-retinyl palmitate, 500,000 IU g⁻¹), 0.25 vitamin D₃ (cholecalciferol, 400,000 IU g⁻¹), 0.075 vitamin K₁ (phyloquinone), 974.655 powdered sucrose

^dMineral mix, g kg⁻¹ mix: 357 calcium carbonate anhydrous CaCO₃, 196 dipotassium phosphate K₂HPO₄, 70.78 potassium citrate C₆H₅K₃O₇, 74 sodium chloride NaCl, 46.6 potassium sulphate K₂SO₄, 24 magnesium oxide MgO, 18 microelement mixture^e, starch to 1 kg = 213.62

^eMicroelement mixture, g kg⁻¹ mix: 31 iron (III) citrate (16.7% Fe), 4.5 zinc carbonate ZnCO₃ (56% Zn), 23.4 manganese (II) carbonate MnCO₃ (44.4% Mn), copper carbonate CuCO₃ (55.5% Cu), 0.04 potassium iodide KI, citric acid C₆H₈O₇ to 100 g

^fCorn starch preparation: crude protein 0.6%, crude fat 0.9%, ash 0.2%, total dietary fibre 0%, water 8.8%

The experimental sources of dietary Cr, chromium(III) picolinate (Cr-Pic), chromium(III)-methioninate (Cr-Met), and chromium nanoparticles (Cr-NP), were added to the diet as an emulsion together with dietary rapeseed oil rather than in the mineral mixture (MX)

diet were used in the experiment: a standard diet (diet S) containing 8% rapeseed oil and 5% cellulose as sources of fat and dietary fibre, respectively, and a high-fat, low-fibre diet (HFD), which was a modification of diet S with 17% lard added in place of maize starch and with cellulose content reduced to 3%. All diets had an identical amount of dietary protein originating from a casein preparation (Lacpol Co., Murowana Goslina, Poland) and DL-methionine, comprising 20% and 0.3% of the diets, respectively. Different chromium sources, i.e. chromium(III) picolinate (Cr-Pic), chromium(III)-methioninate (Cr-Met), and chromium nanoparticles (Cr-NP), were added to the standard and high-fat diets. Chromium picolinate (Cr-Pic; purity > 980 g/kg) was purchased from Sigma-Aldrich Sp. z o.o. (Poznan,

Poland). Chromium-methionine complex (Cr-Met) was purchased from Innobio Co., Ltd. (Siheung, Korea). Chromium nanoparticles (Cr-NP) with 99.9% purity, size 60–80 nm, spherical shape, specific surface area 6–8 m²/g, bulk density 0.15 g/cm³, and true density 8.9 g/cm³, was produced and purchased from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA).

The dosage of Cr administered to each rat was 0.3 mg/kg BW and was chosen in accordance with recommendations by the EFSA [31]. To ensure the safety of the individual preparing the experimental diets, the Cr-NP preparation, as well as the other Cr sources in order to maintain comparable conditions, was added to the diet not in a mineral mixture, but as an emulsion together with dietary rapeseed oil.

Sample collection

The feeding period was 8 weeks. Individual feed consumption of rats were determined. All physiological measurements were made for each animal separately ($n = 7$ for each group). Cr digestibility and utilisation tests (balance tests) were carried out during the study. After a 10 days preliminary period (days 8–17 of experimental feeding), faeces and urine were collected for 5 days (days 18–22) from all rats kept in the metabolic cages. The content of Cr in the diets, drinking water, faeces and urine collected in the balance period was assayed using the methods described below.

At the end of the experiment, the rats were fasted for 12 h and anaesthetized *i.p.* with ketamine and xylazine (K, 100/kg BW; X, 10 mg/kg BW) according to recommendations for anaesthesia and euthanasia of experimental animals. Following laparotomy, blood samples were taken from the caudal vena cava into heparinized tubes, and finally the rats were euthanized by cervical dislocation. The blood plasma was prepared by solidification and low-speed centrifugation (350×g, 10 min, 4 °C). Plasma samples were kept frozen at – 70 °C until assayed.

Laboratory analysis

Chromium was determined colorimetrically by reaction with 1,5-diphenylcarbazide (DPC) in acid solution. About 2 g of the sample was mineralized in a muffle furnace at 550 °C and dissolved in 3 mL of sulphuric acid (5 mol/L). To convert trivalent chromium to its hexavalent state the dissolved ash was transferred from the crucible to a conical flask and heated to the boiling point with potassium permanganate. Potassium permanganate (0.1% in water) was added in 50 μ L portions until the oxidation process was completed (the slightly violet colour of the potassium permanganate disappeared until trivalent chromium was present in the solution). The mixture was allowed to cool to room temperature and then transferred to a 50 mL volumetric flask, to which 2 mL

of sulphuric acid (5 mol/L) and 0.3 mL of phosphoric acid (98%) were added. Then 24 mL of acidified solution was transferred to a 25 mL volumetric flask containing 1 mL of DPC (0.25% in acetone). The contents were mixed and diluted to mark with distilled water. The absorbance was measured after 15–20 min at 546 nm using a GENESYS 20 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Kits produced by Cell Biolabs, Inc. (San Diego, USA) were used to determine the level of the hormones leptin, ghrelin, insulin, glucagon, serotonin, noradrenaline, and histamine. Content of minerals (Ca, Mg, Fe, and Zn) in the blood samples was determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS).

Statistical analysis

The results are expressed as means and pooled SEM (standard error of the mean). Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effect of the Cr source (Cr: none, Cr-Pic, Cr-Met, or Cr-NP) and the diet type (D: standard or high-fat diet) and the interaction between these two factors (Cr×D). If the analysis revealed a significant interaction ($P \leq 0.05$), the differences between treatment groups were then determined by Duncan's post hoc test at $P \leq 0.05$. The data were checked for normality prior to the statistical analyses. The statistical analysis was performed using STATISTICA software, version 10.0 (StatSoft Corp., Krakow, Poland).

Results

Effect of high-fat diet

Administration of a high-fat diet to rats decreased feed intake ($P < 0.001$), Cr intake from the diet and total Cr intake ($P < 0.001$, both), Cr digestibility and Cr retention ($P < 0.001$, both) and increased Cr excretion in the faeces ($P = 0.005$) compared to the group receiving a standard diet (Table 2). Administration of a high-fat diet to rats decreased the levels of insulin ($P = 0.017$), ghrelin ($P = 0.005$), noradrenaline ($P = 0.032$) and histamine ($P < 0.001$) and increased those of leptin ($P = 0.019$) and serotonin ($P = 0.048$) compared to the group receiving a standard diet (Table 3). The plasma of rats receiving a high-fat diet had lower levels of Ca ($P = 0.028$), P ($P < 0.001$), Mg ($P = 0.010$) and Zn ($P = 0.004$) than the plasma of rats fed a standard diet (Table 4).

Effect of form of Cr

Cr content in the diet ($P < 0.001$), Cr intake from the diet ($P < 0.001$), total Cr intake ($P < 0.001$), and excretion of Cr in the urine and faeces ($P = 0.033$, $P < 0.001$, respectively) were all higher in the groups receiving a diet with added Cr, irrespective of its form. Cr % digestibility and Cr % retention were higher in the rats receiving a diet with added Cr-Pic or Cr-Met and lower in rats receiving Cr-NP ($P < 0.001$, all) than in rats receiving a diet without added Cr (Table 2).

The leptin level in the plasma of rats receiving a diet with the addition of Cr-Pic or Cr-Met was higher than in rats receiving a diet without added Cr or with the addition

Table 2 Chromium excretion patterns in the digestibility and retention test

Item	Diet (D)		Cr form (Cr)				SEM	P value		
	Standard	High-fat	None	Cr-Pic	Cr-Met	Cr-NP		D effect	Cr effect	Interaction (Cr×D)
Cr content of diet (mg/kg)	3.31	3.34	1.24 ^b	3.99 ^a	4.02 ^a	4.03 ^a	0.161	0.067	<0.001	0.057
Cr intake from diet (mg/5 day) ^A	0.282 ^a	0.253 ^b	0.100 ^b	0.328 ^a	0.322 ^a	0.319 ^a	0.013	<0.001	<0.001	0.082
*total Cr intake (mg/5d) ^B	0.282 ^b	0.253 ^a	0.100 ^b	0.328 ^a	0.322 ^a	0.319 ^a	0.013	<0.001	<0.001	0.082
Excretion of Cr in urine (mg)	0.009	0.010	0.006 ^b	0.010 ^a	0.011 ^a	0.013 ^a	0.001	0.373	0.033	0.120
Excretion of Cr in faeces (mg)	0.128 ^b	0.174 ^a	0.062 ^c	0.166 ^b	0.164 ^b	0.213 ^a	0.012	0.005	<0.001	0.071
Total Cr excretion (mg/5 day)	0.137 ^b	0.185 ^a	0.068 ^c	0.176 ^b	0.175 ^b	0.226 ^a	0.012	0.004	<0.001	0.011
Cr digestibility (%)	52.23 ^a	33.12 ^b	39.32 ^c	51.60 ^a	47.97 ^b	31.79 ^d	2.329	<0.001	<0.001	0.052
Cr retention (%)	48.94 ^a	28.43 ^b	34.07 ^b	48.47 ^a	44.18 ^a	28.04 ^c	2.425	<0.001	<0.001	0.066

^ACr intake from diet calculated from feed intake data presented in Ognik et al. [26]

Feed intake: diet: standard—17.45 g/day, high-fat—16.17 g/day; Cr form: none—19.9 g/day, Cr-Pic—16.8 g/day, Cr-Met—16.8 g/day, Cr-NP—16.7 g/day [26]

^BTotal Cr intake from diet and water (Cr concentration in water administered to rats 2.9 µg/L)

^{a,b,c,d}Mean values within a row with unlike superscript letters were shown to be significantly different ($P < 0.05$)

Table 3 Content of hormones in the blood plasma of rats

Hormone	Diet (D)		Cr form (Cr)				SEM	P value		
	Standard	High-fat	None	Cr-Pic	Cr-Met	Cr-NP		D effect	Cr effect	Interaction (Cr×D)
Leptin, ng/mL	1.163 ^b	1.325 ^a	1.035 ^c	1.341 ^b	1.611 ^a	0.988 ^c	0.057	0.019	<0.001	0.074
Ghrelin, pg/mL	72.97 ^a	62.54 ^b	72.26 ^{ab}	62.58 ^b	75.67 ^a	60.53 ^b	3.743	0.005	0.010	0.126
Insulin, mIU/L	60.22 ^a	55.48 ^b	54.68 ^b	61.49 ^a	57.43 ^{ab}	57.79 ^{ab}	1.740	0.017	0.034	0.133
Glucagon, pg/mL	4679.7	5180.0	5201.6	4846.6	4587.5	5083.8	137.9	0.073	0.401	0.564
Serotonin, ng/ml	1987.6 ^b	2180.7 ^a	1859.9 ^c	2161.7 ^b	2065.7 ^b	2249.3 ^a	56.53	0.048	0.037	0.225
Noradrenaline, pg/mL	441.76 ^a	427.96 ^b	445.14 ^a	396.19 ^b	454.51 ^a	443.58 ^a	7.125	0.032	0.009	0.147
Histamine, ng/ml	484.46 ^a	244.03 ^b	568.43 ^a	239.73 ^c	240.76 ^c	408.06 ^b	33.76	<0.001	<0.001	0.305

^{a,b,c}Mean values within a row with unlike superscript letters were shown to be significantly different ($P<0.05$)

Table 4 Content of minerals in the blood plasma of rats

Item	Diet (D)		Cr form (Cr)				SEM	P value		
	Standard	High-fat	None	Cr-Pic	Cr-Met	Cr-NP		D effect	Cr effect	Interaction (Cr×D)
Ca, mmol/L	2.287 ^a	2.172 ^b	2.297 ^{ab}	2.113 ^b	2.357 ^a	2.150 ^b	0.031	0.028	0.003	0.312
P, mmol/L	4.329 ^a	3.218 ^b	4.333 ^a	2.981 ^c	4.278 ^a	3.503 ^b	0.129	<0.001	<0.001	0.251
Mg, mmol/L	0.831 ^a	0.782 ^b	0.759 ^b	0.841 ^a	0.808 ^{ab}	0.818 ^{ab}	0.010	0.010	0.019	0.542
Fe, μmol/L	12.668	13.031	12.474 ^{ab}	11.517 ^b	13.199 ^{ab}	14.208 ^a	0.453	0.686	0.044	0.298
Zn, μmol/L	19.251 ^a	17.860 ^b	19.064 ^{ab}	17.708 ^b	17.313 ^b	20.136 ^a	0.319	0.004	<0.001	0.126

^{a,b,c}Mean values within a row with unlike superscript letters were shown to be significantly different ($P<0.05$)

of Cr-NP ($P<0.001$). In the plasma of rats receiving Cr-Pic, the insulin level was higher ($P=0.034$) and the noradrenalin level was lower ($P=0.009$) than in the rats from the other groups. The plasma of rats receiving added Cr, irrespective of its form, had a higher level of serotonin ($P=0.037$) and a lower level of histamine ($P<0.001$) (Table 3).

The rats receiving a diet with added Cr-Pic or Cr-NP had a lower plasma Ca level than the rats receiving a diet with Cr-Met ($P=0.003$) and a lower P level ($P<0.001$) than the rats in the other groups. A higher Mg level ($P=0.019$) was noted in the plasma of rats receiving Cr-Pic than in rats from the groups receiving a diet without added Cr. In the rats receiving Cr-NP, the Fe level was higher than in rats receiving Cr-Pic ($P=0.044$). A higher Zn level ($P<0.001$) was noted in the plasma of rats receiving Cr-NP than in those receiving Cr-Pic or Cr-Met (Table 4).

Discussion

The use of high-fat diet, especially for a long time, leads to impairment of carbohydrate and lipid metabolism and to obesity. Rats fed a HFD had higher body weight than rats fed a standard diet despite lower feed intake [26]. Obesity in rats

fed a HFD may be due to the higher caloric value of the diet as well as to increased concentrations of leptin and reduced concentrations of ghrelin, as noted in our study. The decrease of ghrelin level in the plasma observed in obesity is most likely a physiological adaptation to the positive energy balance associated with obesity. Tschöp et al. [32], in a human study, found that the ghrelin level in the plasma is negatively associated with the degree of obesity. Beck et al. [33] and Beck and Richy [34], in a study in rats, also showed that an increase in the fat content of the diet results in reduced secretion of this hormone. Our study showed that the use of a HFD also increases leptin levels in the plasma. Ghrelin, known as the ‘hunger hormone’, and leptin, the ‘satiety hormone’, are negatively correlated. Low ghrelin levels are accompanied by high leptin levels, which is consistent with the results of the present study. Handjieva-Darlenska and Boyadjieva [35] also noted higher leptin levels and lower ghrelin levels in rats fed a high-fat diet than in the control group. Ghrelin can interact with leptin in the CNS, mainly at the level of the arcuate nucleus of the hypothalamus, in which both leptin and ghrelin receptors are present [33, 34]. Leptin is crucial in maintaining glucose homeostasis and is considered to be a factor inhibiting insulin secretion by pancreatic β cells [4, 36]. In our study, the use of a high-fat

diet reduced the insulin level in the plasma of rats. This may be due to damage of pancreas. Our team's previous research [26] showed presence of extensive foci of steatosis in the pancreas of rats fed a high-fat diet. Tuzcu et al. [37] noted an increased insulin level (40 vs 33 pmol/l) in rats fed a HFD compared to rats receiving a standard diet. Sahin et al. [38] also report that a HFD increased the plasma insulin level.

Insulin secretion is additionally influenced by another hormone—serotonin. Paulmann et al. [39] noted that serotonin regulates insulin secretion via serotonylation of GTPases in pancreatic β cells. In our study, rats fed a HFD had higher serotonin and lower noradrenaline levels. Studies by Kim et al. [40] and Bertrand et al. [41] also showed higher serotonin levels in mice fed a HFD. Elevated levels of 5-HIAA, the main metabolite of serotonin, have also been observed in the plasma [42] and urine [43] of humans with obesity. Those two studies also showed a positive correlation between the fasting glucose concentration in the blood and 5-HIAA level. Rats fed a high-fat and high-cholesterol diet have higher expression of Tph1, and thus increased secretion of serotonin from the small intestine [44]. In turn, noradrenaline inhibits gene expression and reduces the level of circulating leptin in the body [4]. Carbohydrate metabolism is affected by histamine as well [45, 46]. Our study showed a reduced histamine level in rats receiving a high-fat diet compared to rats receiving a standard diet. Ji et al. [47] found that administration of the fat emulsion Liposyn II (20%) into the duodenum of rats increased the release of histamine into the intestinal lymph.

The use of a HFD in rats affected not only hormonal metabolism, but also the level of mineral elements in the blood plasma. The high-fat diet in the present study reduced the plasma levels of Cr, Ca, P, Mg and Zn. The lower level of these elements in the plasma may have been due to lower feed intake by rats fed a HFD as well as to increased excretion in the faeces. In addition, Ca, Mg and Zn ions combine with fatty acids to form water-insoluble calcium, magnesium or zinc soaps and are excreted in this form in the faeces [48].

One way to neutralise the negative effect of a HFD is to add Cr to the diet [24]. In the present study, a diet with added Cr, irrespective of its form, increased Cr intake from the diet as well as excretion of this element in the urine and faeces. Kottwitz et al. [49] noted that most of the Cr absorbed from CrCl_3 is excreted in the urine within the first 2 days after it is ingested. Actual intestinal absorption (retention in the entire body and excretion in the faeces) of Cr from Cr-Pic is twice as high as from CrCl_3 , but a large proportion of absorbed Cr-Pic is found in the transport pool directed to excretion by the kidneys. Only a small portion of absorbed Cr-Pic is metabolised in the liver to the physiological form of Cr and stored in the body with a half-life of more than 100 days. For this reason, in the first 24 h after oral administration, most tissues (muscle, fat, bone and brain) show higher concentrations

of ^{51}Cr from CrCl_3 than from Cr-Pic. In the present study, the use of a diet with the addition of organic forms of Cr resulted in greater Cr retention than in rats fed a diet with Cr-NP. According to Lien et al. [24], both nanoparticles of Cr-Pic (55–100 nm) and Cr-Pic administered to rat at dose of $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ show high % digestibility. The higher % retention of Cr from Cr-Pic or Cr-Met in our study suggests that Cr in these forms is more easily digestible than in the form of Cr-NP, and a larger pool of it is retained in the body.

The use of a diet with added organic forms of chromium—Cr-Pic or Cr-Met—resulted in an increase in the plasma level of leptin in rats. Orhan et al. [1], who administered Cr-Pic and biotin or Cr-Hist and biotin to rats fed a HFD noted a reduction of the level of this hormone relative to rats fed a HFD without added Cr. Similarly, Inanc et al. [20] reported a decrease in leptin level in obese women who received chromium as Cr-Pic at $200 \mu\text{g/day}$ for 8 weeks. They did not, however, demonstrate an influence of Cr on the ghrelin or insulin level. Our study showed higher insulin level in the plasma of rats receiving Cr-Pic in their diet. Similarly, rats receiving a diet with Cr-acetate or Cr-glycinate had increased level of insulin in the blood [38]. According to Tuzcu et al. [37], rats fed a HFD supplemented with Cr-His had higher serum insulin level than rats fed a HFD without added Cr, while administration of Cr-His in the control group did not affect the insulin level. The role of Cr in insulin secretion is multi-faceted [50]. Most importantly, Cr increases the activity of 5'AMP-activated protein kinase, which plays a key role in the response to insulin, and insulin receptor kinase, thus enhancing insulin signalling [51, 52]. Chromium also induces translocation of glucose transporter 4 (GluT4) to the cell membrane, thereby promoting glucose metabolism [53].

The present study also showed that the addition of Cr to the diet of rats, irrespective of its form, increased the level of serotonin and reduced the level of histamine in the plasma of the rats. Franklin and Odontiadis [22], in a study on rats fed a diet supplemented with 100 mg/kg Cr in the form of Cr-Pic, also reported an increase in the serotonin level in the brain and increased sensitivity of central serotonin 2A receptors (5-HT_{2A}). This is most likely linked to increased transport of the serotonin precursor tryptophan to the brain through the blood–brain barrier. This process is influenced by the level of tryptophan in the blood, its ratio to branched-chain amino acids (BCAA), and the insulin level [54, 55]. By promoting insulin secretion, chromium may also cause a decrease in the level of histidine, a histamine precursor. Moreover, histamine influences carbohydrate metabolism in the body by regulating the glucose level in the blood [45, 46]. In our study, only rats receiving Cr-Pic in their diet had a reduced level of noradrenaline. Franklin and Odontiadis [22] reported a higher level of noradrenaline in the brain of rats receiving 100 mg/kg Cr-Pic. Noradrenaline is one of the

hormones that regulates lipolysis. A reduced noradrenaline level and increased insulin level in the plasma of rats receiving Cr-Pic may indicate inhibition of lipolysis. The addition of Cr to the diet of rats in the form of Cr-Pic or Cr-NP resulted in a decrease in the level of P and an increase in the concentration of Mg in the plasma of rats. This mechanism is not fully explained and requires further research.

Conclusions

A high-fat diet was shown to negatively affect the level of hormones regulating carbohydrate metabolism (increasing leptin level and decreasing levels of ghrelin and insulin). Cr in organic forms was found to be better retained in the body of rats than Cr in nanoparticles form. However, Cr-Pic was the only form that increased the insulin level, which indicates its beneficial effect on carbohydrate metabolism. Rats fed a high-fat diet had an increased level of serotonin and a reduced level of noradrenaline. The addition of Cr to the diet, irrespective of its form, also increased the serotonin level, which should be considered a beneficial effect. Rats fed a high-fat diet had an unfavourable reduction in the plasma concentrations of Ca, P, Mg and Zn. The reduction in P in the plasma induced by supplementation with Cr in the form of Cr-Pic or Cr-NP may exacerbate the adverse effect of a high-fat diet on the level of this element.

Author contributions AS: conceptualization, methodology, formal analysis, writing—original draft. KT: formal analysis. JJ: conceptualization, methodology, resources. KO: conceptualization, methodology, resources, supervision, writing—review & editing.

Funding This work was supported by the National Science Centre, Grant No. 2020/39/B/NZ9/00674.

Availability of data and material All relevant data are within the paper and its supporting information files. Additional data are available on request from the corresponding authors.

Declarations

Conflicts of interest All authors state that they have no conflicts of interest.

Ethics approval The Animal Care and Use Committee in Olsztyn (Poland) approved the experimental protocol (approval no. 04/2019).

Informed consent For this type of study, no informed consent is required.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long

as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References







- Orhan C, Kucuk O, Tuzcu M, Sahin N, Komorowski JR, Sahin K (2019) Effect of supplementing chromium histidinate and picolinate complexes along with biotin on insulin sensitivity and related metabolic indices in rats fed a high-fat diet. *Food Sci Nutr* 7:183–194. <https://doi.org/10.1002/fsn3.851>
- Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, Tibiriçá E (2013) Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity* 21:2046–2054. <https://doi.org/10.1002/oby.20358>
- Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn AW (2007) Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet induced obesity. *Diabet Obes Metab* 9:840–852. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00653.x>
- Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV (1999) Leptin: fundamental aspects. *Int J Obesity Rel Metab Disord* 23:22–28. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800791>
- Bernotiene E, Palmer G, Gabay C (2006) The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthr Res Ther* 8:217–227. <https://doi.org/10.1186/ar2004>
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714–1719. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1714>
- Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Kocetlak P, Janowska J, Semik-Grabarczyk E (2008) The effect of weight reduction on plasma concentrations of ghrelin and insulin-like growth factor 1 in obese women. *Endokryn Pol* 59:301–304
- Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW (1999) Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848:114–123. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01974-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01974-5)
- Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW, Niswender KD (2009) Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1003–E1012. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90377.2008>
- Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW (2004) Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 15:362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.07.009>
- Haleem DJ (2016) Drug targets for obesity and depression: from serotonin to leptin. *Curr Drug Targets* 17:1282–1291. <https://doi.org/10.2174/1389450117666151209123049>
- Schwartz MW (2006) Central nervous system regulation of food intake. *Obesity* 14:1S–8S. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.275>

13. Halford J, Harrold J, Lawton C, Blundell J (2012) Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets* 6:201–213. <https://doi.org/10.2174/1389450053174550>
14. van Galen KA, Ter Horst KW, Booij J, la Fleur SE, Serlie MJ (2018) The role of central dopamine and serotonin in human obesity: lessons learned from molecular neuroimaging studies. *Metabolism* 85:325–339. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.007>
15. Haleem DJ, Khalid M (2021) Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats. *Nutr Neurosci* 24:226–235. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1619983>
16. Labban RSM, Alfawaz H, Almnazil AT, Hassan WM, Bhat RS, Moubayed NMS, Björklund G, El-Ansary A (2020) High-fat diet-induced obesity and impairment of brain neurotransmitter pool. *Translat Neurosci* 11:147–160. <https://doi.org/10.1515/tncsi-2020-0099>
17. dos Santos MCF, Anderson CP, Neschen S, Zumbrennen-Bullough KB, Romney SJ, Kahle-Stephan M, Rathkolb B, Gailus-Durner V, Fuchs H, Wolf E, Rozman J, de Angelis MH, Cai WM, Rajan M, Hu J, Dedon PC, Leibold EA (2020) Irf2 regulates insulin production through iron-mediated Cdkal1-catalyzed tRNA modification. *Nat Commun* 11:296. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14004-5>
18. García-Colunga J, Reyes-Haro D, Godoy-García IU, Mileli R (2005) Zinc modulation of serotonin uptake in the adult rat corpus callosum. *J Neurosci Res* 80:145–149. <https://doi.org/10.1002/jnr.20421>
19. Kim BG, Lindemann MD, Cromwell GL (2010) Effects of dietary chromium (III) picolinate on growth performance, respiratory rate, plasma variables, and carcass traits of pigs fed high-fat diets. *Biol Trace Elem Res* 133:181–196. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8417-7>
20. Inanç N, Uyanik F, Sahin H, Yaman H, Erdem O (2006) Effects of chromium supplementation on body composition, leptin, ghrelin levels and selected biochemical parameters in obese women. *Trace Elem Electro* 23:128–133. <https://doi.org/10.5414/TEP23128>
21. Suksomboon N, Poolsup N, Yuwanakorn A (2014) Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of chromium supplementation in diabetes. *J Clin Pharm Therap* 39:292–306. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12147>
22. Franklin M, Odontiadis J (2003) Effects of treatment with chromium picolinate on peripheral amino acid availability and brain monoamine function in the rat. *Pharmacopsychology* 36:176–180. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43046>
23. Feng W, Zhao T, Mao G, Wang W, Feng Y, Li F, Zheng D, Wu H, Jin D, Yang L, Wu X (2015) Type 2 diabetic rats on diet supplemented with chromium malate show improved glycometabolism, glycometabolism-related enzyme levels and lipid metabolism. *PLoS ONE* 10:e0125952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125952>
24. Lien TF, Yeh HS, Lu FY, Fu CM (2009) Nanoparticles of chromium picolinate enhance chromium digestibility and absorption. *J Sci Food Agric* 89:1164–1167. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3569>
25. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA (2004) Stability and absorption of chromium and absorption of chromium histidinate complexes by humans. *Biol Trace Elem Res* 101:211–218. <https://doi.org/10.1385/BTER:101:3:211>
26. Ognik K, Dworzański W, Sembratowicz I, Fotschki B, Cholewińska E, Listos P, Juśkiewicz J (2021) The effect of the high-fat diet supplemented with various forms of chromium on rats body composition, liver metabolism and organ histology Cr in liver metabolism and histology of selected organs. *J Trace Elem Med Biol* 64:126705. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126705>
27. Dworzański W, Sembratowicz I, Cholewińska E, Tutaj K, Fotschki B, Juśkiewicz J, Ognik K (2021) Effects of different chromium compounds on hematology and inflammatory cytokines in rats fed high-fat diet. *Front Immunol* 12:614000. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.614000>
28. Dworzański W, Cholewińska E, Fotschki B, Juśkiewicz J, Listos P, Ognik K (2020) Assessment of DNA methylation and oxidative changes in the heart and brain of rats receiving a high-fat diet supplemented with various forms of chromium. *Animals* 10:1470. <https://doi.org/10.3390/ani10091470>
29. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *J. Europ. Union* 53:33–79
30. Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 Diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127:838S–841S. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.838S>
31. EFSA (2014) Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA J* 12:3845. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3845>
32. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707–709. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.707>
33. Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A (2002) Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 292:1031–1035. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6737>
34. Beck B, Richey S (2008) Differential long-term dietary regulation of adipokines, ghrelin, or corticosterone: impact on adiposity. *J Endocrinol* 196:171–179. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0468>
35. Handjieva-Darlenska T, Boyadjieva N (2009) The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Physiol Biochem* 65:157–164. <https://doi.org/10.1007/BF03179066>
36. Yu X, Park BH, Wang MY, Wang ZV, Unger RH (2008) Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14070–14075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806993105>
37. Tuzcu M, Sahin N, Orhan C, Agca CA, Akdemir F, Tuzcu Z, Komorowski J, Sahin K (2011) Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr Metab* 8:28. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-28>
38. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Agca CA, Sahin N, Guvenc M, Krejpcio Z, Staniek H, Hayirli A (2011) The effects of chromium complex and level on glucose metabolism and memory acquisition in rats fed high-fat diet. *Biol Trace Elem Res* 143:1018–1030. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8905-9>
39. Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinkel J, Bader M, Skelin M, Jevsek M, Fink H, Rupnik M, Walther DJ (2009) Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol* 7:e1000229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229>
40. Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, Park JH, Yang HJ, Kim MS, Kwon DY, Yoon SH (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res* 10:722–731. <https://doi.org/10.1021/pr100892r>
41. Bertrand RL, Senadheera S, Markus I, Liu L, Howitt L, Chen H, Murphy TV, Sandow SL, Bertrand PP (2011) A Western diet increases serotonin availability in rat small intestine. *Endocrinology* 152:36–47. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0377>
42. Fukui M, Tanaka M, Toda H, Asano M, Yamazaki M, Hasegawa G, Imai S, Nakamura N (2012) High plasma 5-hydroxyindole-3-acetic acid concentrations in subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 35:163–167. <https://doi.org/10.2337/dc11-1619>

43. Takahashi T, Yano M, Minami J, Haraguchi T, Koga N, Higashi K, Kobori, (2002) Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin_{2A} receptor antagonist, reduces albuminuria in diabetic patients with early-stage diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 58:123–129. [https://doi.org/10.1016/s0168-8227\(02\)00105-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8227(02)00105-5)
44. Bertrand PP, Bertrand RL (2010) Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Autonom Neurosci* 153:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.08.002>
45. Masaki T, Yoshimatsu H (2007) Neuronal histamine and its receptors in obesity and diabetes. *Curr Diabetes Rev* 3:212–216. <https://doi.org/10.2174/157339907781369002>
46. Sim YB, Park SH, Kim SS, Kim CH, Kim SJ, Lim SM, Jung JS, Ryu OH, Choi MG, Suh HW (2014) The modulatory role of spinally located histamine receptors in the regulation of the blood glucose level in d-glucose-fed mice. *Korea J Physiol Pharmacol* 18:41–46. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.41>
47. Ji Y, Sakata Y, Li X, Zhang C, Yang Q, Xu M, Wollin A, Langhans W, Tso P (2013) Lymphatic diamine oxidase secretion stimulated by fat absorption is linked with histamine release. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304:G732–G740. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00399.2012>
48. Frommelt L, Bielohuby M, Stoehr BJ, Menhofer D, Bidlingmaier M, Kienzle E (2014) Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition* 30:869–875. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.017>
49. Kottwitz K, Laschinsky N, Fischer R, Nielsen P (2009) Absorption, excretion and retention of ⁵¹Cr from labelled Cr-(III)-picolinate in rats. *Biometals* 22:289–295. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9165-4>
50. Tinkov AA, Popova EV, Polyakova VS, Kwan OV, Skalny AV, Nikonorov AA (2015) Adipose tissue chromium and vanadium disbalance in high-fat fed Wistar rats. *J Trace Elem Med Biol* 29:176–181. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.07.006>
51. Hoffman NJ, Penque BA, Habegger KM, Sealls W, Tackett L, Elmendorf JS (2014) Chromium enhances insulin responsiveness via AMPK. *J Nutr Biochem* 25:565–572. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.01.007>
52. Wang H, Kruszewski A, Brautigan DL (2005) Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase. *Biochemistry* 44:8167–8175. <https://doi.org/10.1021/bi0473152>
53. Chen G, Liu P, Pattar GR, Tackett L, Bhonagiri P, Strawbridge B, Elmendorf JS (2006) Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 20:857–870. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0255>
54. Attenburrow MJ, Odontiadis J, Murray BJ, Cowen PJ, Franklin M (2002) Chromium treatment decreases the sensitivity of 5-HT_{2A} receptors. *Psychopharmacology* 4:432–436. <https://doi.org/10.1007/s00213-001-0960-7>
55. Brownley KA, Boettiger CA, Young L, Cefalu WT (2015) Dietary chromium supplementation for targeted treatment of diabetes patients with comorbid depression and binge eating. *Med Hypotheses* 85:45–48. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.03.020>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Effect of Chromium Picolinate and Chromium Nanoparticles Added to Low- or High-Fat Diets on Chromium Biodistribution and the Blood Level of Selected Minerals in Rats

Anna Stępniewska¹ , Jerzy Juśkiewicz^{2*} , Krzysztof Tutaj¹ , Joanna Fotschki³ ,
Bartosz Fotschki² , Katarzyna Ognik¹ 

¹Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Animal Science and Bioeconomy,
University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20–950 Lublin, Poland

²Department of Biological Functions of Food, Division of Food Science,
Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10–748 Olsztyn, Poland

³Department of Immunology and Food Microbiology, Division of Food Science,
Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10–748 Olsztyn, Poland

Key words: minerals, chromium, nanoparticles, high-fat diet

The metabolism of chromium (Cr), calcium (Ca), phosphorus (P), iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) is interconnected, and their deficiency or excessive accumulation may lead to various disturbances, including anemia and diabetes. The current research was undertaken to determine whether low-fat or high-fat diets with the Cr(III) addition in the form of picolinate (CrPic) or nanoparticles (CrNPs) have an interactive effect on the retention and accumulation of this element in organs and the content of P, Ca, Fe, Cu and Zn in the blood plasma of rats. The experiment was performed using 48 outbred male Wistar rats fed a low-fat or high-fat semi-purified rat diet with dietary addition of chromium at a dose of 0.3 mg/kg body weight. The obtained results point to the paramount importance of the dietary Cr form on the excretion pattern of this microelement. It has been found that CrNPs were to a greater extent excreted from the rat's body *via* urine and feces in comparison to CrPic, as indicated by the values of the Cr retention index (44.4 vs. 65.9%, respectively). The additional dietary Cr, irrespective of its form and diet type, was not accumulated in the analyzed internal organs, *i.e.* brain, spleen, kidneys, liver, thigh bone, and thigh muscle. It should be stressed that dietary CrPic, unlike CrNPs, added to the high-fat diet adversely reduced plasma concentration of vital minerals in comparison to the levels observed in rats fed the low-fat diet, *i.e.* Zn (60.5 vs. 69.9 μ M), Cu (13.6 vs. 15.7 μ M), and P (1.12 vs. 1.30 μ M). In turn, the CrNPs, but not CrPic, added to the high-fat diet decreased plasma Fe level (1.41 vs. 2.43 μ M).

INTRODUCTION

The available literature provides ample evidence that trivalent chromium (Cr(III)) is an important micromineral actively involved in the metabolic fate of carbohydrates, lipids, and proteins [Dworzański *et al.*, 2020, 2021; Inanç *et al.*, 2006; Ognik *et al.*, 2021; Sahin *et al.*, 2011; Suksomboon *et al.*, 2014; Tuzcu *et al.*, 2011]. On the other hand, there are many unanswered questions about Cr(III) supplementation as there are also articles questioning its importance [Stearns, 2000]. Chromium's advantage is that its safety was confirmed by no detrimental health consequences of dietary inclusion of trivalent Cr in animal experiments [Pechova & Pavlata, 2007]. In the released opinion of the European Food Safety Authority (EFSA), Cr(III) should not be considered as an essential nutrient [EFSA, 2014], but it is currently deemed a stock supplementary ingredient.

The intestinal tract is the main route of Cr(III) entering the internal tissues. In rodents, its most active absorption processes occur in the jejunum; while its absorption is less effective in the ileum and duodenum [Pechova & Pavlata, 2007]. Chromium is absorbed from the intestine to a little extent, with the absorption rate ranging from 0.4% to 2.0%. The retention rate of Cr from inorganic and organic species has been reported at less than 3% for the former and ten times higher for the latter [Lyons, 1994]. It should be stressed that the literature *in vivo* data describing the Cr accumulation in internal tissues and organs is relatively scarce [Anderson *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1992; Lindemann *et al.*, 2008; Şahin *et al.*, 2001; Staniek *et al.*, 2013].

High blood insulin level was shown as a diminishing factor in regard to Cr cycled in the body as chromium is incorporated to insulin-dependent cells *via* the low molecular weight chromium-binding substance (LMWCr) [Davis, 1997].

* Corresponding Author:

E-mail: j.juskiewicz@pan.olsztyn.pl (J. Juśkiewicz)

Submitted: 30 May 2022

Accepted: 30 June 2022

Published on-line: 27 July 2022



Król *et al.* [2014] found that the administration of a high-fat diet caused elevated insulin levels in rat serum, regardless of Cr dietary application (applied doses of 10 or 50 mg Cr propionate per kg diet). It is worth noting that hepatic Cr accumulation may be enhanced under conditions of insulin-related disturbances. Studies on Cr distribution in rat tissues have demonstrated its highest content in the kidneys [Prescha *et al.*, 2014]. Previous studies addressing the impact of dietary Cr on tissue levels of other mineral components have shown a significant interaction of Cr with Fe [Anderson *et al.*, 1996; Lindemann *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2010]. Dietary Cr(III) has been reported to affect the metabolism of other macro- and micro-elements, for instance increased Zn level and diminished that of Cu [Vlizlo *et al.*, 2014]. The maintenance of the right, balanced physiological status of trace minerals, *i.e.* Fe, Zn, Cu, and Cr, seems to be of paramount importance. Undoubtedly, the metabolic fate of Fe, Cr, Cu, and Zn is mutually dependent and the body's mineral status and may greatly affect the occurrence of several physiological and metabolic disturbances, *e.g.* diabetes, anemia, or insulin-resistance.

The current research was undertaken to determine whether low-fat or high-fat diets with the addition of Cr in the form of chromium picolinate or nanoparticles have an interactive effect on the retention and accumulation of this element in organs and the contents of other minerals (P, Ca, Fe, Cu and Zn) in the blood plasma of rats.

MATERIAL AND METHODS

Chromium used in experiments

Chromium in the two forms was used as the additive to rat diets: chromium nanoparticles (CrNPs) and chromium picolinate (CrPic). CrNPs powder (with spherical morphology) was characterized by high purity (999 g/kg), large surface area (6–8 m²/g), bulk density of 0.15 g/mL, and true density of 8.9 g/mL and was acquired in SkySpring Nanomaterials Inc. (Houston, TX, USA). CrPic was purchased in Merck Co. (Darmstadt, Germany). Its purity was also high, >980 g/kg.

Animals

The experiment was performed using 48 outbred male Wistar rats (Cmdb:Wi CMDDB) fed a low-fat or high-fat semi-purified rat diet (LFD and HFD, respectively) with dietary addition of chromium nanoparticles or chromium picolinate. The study schema consisted of two periods, *i.e.* initial and experimental, each of 9 weeks. During the initial 9-wk period, the rats aged 6-wk were fed a HFD. After the initial period, the high-fat rats were randomly divided into 4 groups with $n=12$ per group and fed, for the subsequent 9-wk, the following dietary treatments: the LFD-CrPic group was fed a standard low-fat diet supplemented with chromium picolinate; the LFD-CrNPs group – a standard low-fat diet supplemented with chromium nanoparticles; the HFD-CrPic group – a high-fat diet supplemented with chromium picolinate; and the HFD-CrNPs group – a high-fat diet supplemented with nanoparticle chromium (Table 1). The rats were administered chromium in a daily dose of 0.3 mg/kg of body weight (BW) proposed by the EFSA NDA Panel [2014] as a highly safe dose without any harmful side-effects. In order

TABLE 1. Composition of low-fat diet (LFD) and high-fat diet (HFD) with chromium picolinate (CrPic) and chromium nanoparticles (CrNPs) used in the experiment (g/kg).

	LFD-CrPic	HFD-CrPic	LFD-CrNPs	HFD-CrNPs
Casein ¹	148	148	148	148
DL-Methionine	2	2	2	2
Cellulose ²	80	30	80	30
Choline chloride	2	2	2	2
Cholesterol	3	3	3	3
Vitamin mix ³	10	10	10	10
Mineral mix ⁴	35	35	35	35
Maize starch ⁵	640	520	640	520
Rapeseed oil	80 (with Cr-Pic) ⁶	80 (with Cr-Pic) ⁶	80 (with Cr-NP) ⁶	80 (with Cr-NP) ⁶
Lard	0	170	0	170

¹Casein preparation: crude protein 89.7 g/100 g, crude fat 0.3 g/100 g, ash 2.0 g/100 g, and water 8.0 g/100 g.

² α -Cellulose (SIGMA, Poznan, Poland), main source of dietary fibre.

³AIN-93G-VM [Reeves, 1997], mix (g/kg): 3.0 nicotinic acid, 1.6 Ca pantothenate, 0.7 pyridoxine-HCl, 0.6 thiamine-HCl, 0.6 riboflavin, 0.2 folic acid, 0.02 biotin, 2.5 vitamin B₁₂ (cyanocobalamin, 0.1% in mannitol), 15.0 vitamin E (all-*rac*- α -tocopheryl acetate, 500 IU/g), 0.8 vitamin A (all-*trans*-retinyl palmitate, 500,000 IU/g), 0.25 vitamin D₃ (cholecalciferol, 400,000 IU/g), 0.075 vitamin K₁ (phyloquinone), 974.655 powdered sucrose.

⁴Mineral mix, mix (g/kg): 357 calcium carbonate anhydrous, 196 dipotassium phosphate, 70.78 potassium citrate, 74 sodium chloride, 46.6 potassium sulfate, 24 magnesium oxide, 18 microelement mixture, 213.62 starch (to 1 kg). Microelement mixture, mix (g/kg): 31 iron (III) citrate (16.7% Fe), 4.5 zinc carbonate (56% Zn), 23.4 manganese (II) carbonate (44.4% Mn), copper carbonate (55.5% Cu), 0.04 potassium iodide, citric acid to 100 g.

⁵Maize starch preparation: crude protein 0.6 g/100 g, crude fat 0.9 g/100 g, ash 0.2 g/100 g, total dietary fibre 0 g/100 g, and water 8.8 g/100 g.

⁶The dosage of CrPic or CrNPs: 0.3 mg/kg body weight.

to maintain a safe and comparable regimen while preparing the diets, both sources of Cr were added along with rapeseed oil and not in the mineral mix.

The *in vivo* protocol including all manipulations planned to be performed on living rats was in compliance with regulations and ordinances in force in Poland, and Directive 2010/63/EU for animal use in research and education. The application for conducting *in vivo* experiment was accepted by the National Ethics Committee for Animal Experiments (Approval No. 73/2021).

Throughout the study, all animals were kept individually in stainless steel cages in an animal laboratory room with proper for the rodents inside temperature (22±1°C), relative humidity 60±5%, a 12-h day-night regimen, and an air exchange rate of 15 changes per 60 min. The rats were thoroughly scrutinized by the well-trained staff and the veterinarian towards a proper behaviour and health status. All humane endpoints in animal research mentioned in Directive 2010/63/EU were tailored strictly in the present study. The superordinate and the veterinarian were informed daily in the case of any sign of rat distress or pain. For 18 weeks (9-wk of the initial

and 9-wk of the experimental period), the animals were provided with free access to tap water and daily amount of semi-purified diets in order to keep the experimental dosage of additional dietary chromium. The diets constructed from well-known ingredients were stored at 4°C in plastic tubes for food and perishables during all the feeding period. The experimental dietary treatments for rats were constructed according to the rules described by Reeves [1997] and approved by the American Institute of Nutrition. The diets were based on casein as the main protein source, rapeseed oil as a fat source (oil was coupled with lard in the high-fat diets), and maize starch as a carbohydrate source. The experimental calculations and analyses of biological animal material were performed individually for each rat.

On day 28, the rats were relocated to the balance cages in order to conduct the Cr balance trial which enabled calculations of the Cr digestibility and retention (utilization) coefficients. The construction of the cages (TECNIPLAST S.p.A., Buguggiate, Italy) facilitates an exact collection of feces and urine excreted by an animal. The balance test consisted of a preliminary period lasting 10 days as well as a relevant balance 5-day period during which all excreted feces and urinated liquid were collected to special tubes kept then in the fridge environment. During the relevant balance days, the amounts of ingested diets and drank water were also recorded for each rat. All collected samples, *i.e.* fecal, urinal, dietary, and water ones, were analyzed for Cr content as described below.

The Cr digestibility was expressed as a percentage of the mineral ingested:

$$\text{Cr digestibility (\%)} = \frac{\text{Cr intake} - \text{Cr excreted in feces}}{\text{Cr intake}} \times 100 \quad (1)$$

The Cr retention (utilization) was calculated as follows:

$$\text{Cr retention (\%)} = \frac{\text{Cr intake} - \text{Cr excreted in feces and urine}}{\text{Cr intake}} \times 100 \quad (2)$$

During the entire feeding experiment, the rats were individually monitored for body weight and diet consumed. Before the termination of the rats, they were deprived of feed for 12 h but still had full access to tap water. On termination day, the animals were anesthetized with the mixture of ketamine (Ke) and xylazine (X) in 0.9% NaCl (Ke, 100 mg/kg BW; X, 10 mg/kg BW) according to the anaesthesia and euthanasia guidelines for laboratory rodents. The unconscious (a painless state) rats were then laparotomized, and their blood was collected from *caudal vena cava* into heparinized tubes in order to obtain blood plasma *via* centrifugation (350×g, 10 min, 4°C). Plasma samples were kept frozen at -70°C until assayed. After blood collection, the rats were euthanized by cervical dislocation in order to confirm the death. The selected internal organs and tissues (liver, kidneys, brain, spleen, thigh muscle, thigh bones) were cut off, weighed if needed, frozen in liquid nitrogen (-196°C), and stored in the low-temperature freezers at -70°C.

Mineral analysis

The concentration of minerals (Cr, P, Ca, Mg, Fe, Cu, and Zn) in the blood plasma samples (0.25 mL) and Cr content in feces, urine, water, diet, and tissue samples

(0.5 g, 0.25 mL, 0.25 mL, 0.5 g and 0.5 g, respectively) were determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) with the aid of a Perkin-Elmer M 5000 atomic absorption spectrometer coupled with an HGA 500 graphite furnace (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Co., Shelton, CT, USA). The furnace program was applied to Cr determination in diets, feces, and tissues with a wavelength of 357.9 nm, drying at 110°C, ashing at 1200°C, atomization and cleaning at 2700°C. In the case of the remaining minerals, the microwave oven (Milestone MLS 1200 MEGA, Milestone, Italy) digestion with HNO₃ was applied at three subsequent periods (5 min each) with the heating power of 210, 420, and 560 W, respectively. The FAAS instrument setting and conditions followed the manufacturers' recommendations. The calibration procedure was done with the aid of the Certipure multi-element standard solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The air-acetylene oxidizing flame was used in the FAAS procedure, whereas a D₂ lamp was used for background corrections in the case of Cr, Ca, Fe and Zn determination.

Statistical analysis

In tables, the results are presented as means with standard error of the mean (SEM), the latter calculated as standard deviations (SD) divided by square root of the number of rats ($n=48$). The two-way ANOVA was applied in order to assess p -values for the two main effects, namely the dietary Cr form (Cr; CrPic and CrNPs) and the diet type (D; LFD and HFD) as well as for the occurrence of a significant interaction between the two main factors (Cr×D). In the case of a significant Cr×D interaction ($p<0.05$), the post-hoc Duncan's test was applied to assess statistical differences among all four experimental groups. The two-way ANOVA requires the normal distribution of samples, so the data were checked for normality *via* the Shapiro-Wilk test. The STATISTICA ver. 12.0 software (StatSoft Corp., Krakow, Poland) was used in the analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Long-term use of an ill-balanced diet leads to many metabolic disorders, including obesity, caused by chronic consumption of a diet rich in saturated fats [Nascimento *et al.*, 2013; Orhan *et al.*, 2019; Żary-Sikorska *et al.*, 2021]. An increased level of dietary fat may additionally disturb the mineral homeostasis in the body [Meli *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2020; Stepińska *et al.*, 2022]. The present research showed that the total level of Cr in the HFD was higher than in the LFD, regardless of Cr form ($p<0.001$; Table 2). In turn, the calculated intake of Cr during the balance test was higher in rats fed the HFD supplemented with CrNPs than in those fed the LFD (see the significant Cr×D interaction). The aforementioned results may be partly ascribed to the formation of adducts composed of Cr nanoparticles and high levels of saturated fatty acids in the HFD treatment [Muller *et al.*, 2017]. Irrespective of diet type, higher urinary Cr excretion was noted when dietary chromium was in the CrNPs form in comparison to that added as CrPic ($p=0.001$). Two-way ANOVA showed the Cr×D interaction also for fecal Cr excretion ($p<0.001$), total Cr excretion ($p<0.001$), Cr digestibility ($p<0.001$),

TABLE 2. Chromium excretion patterns in the digestibility and retention test in rats fed experimental diets.

	Cr content of diet (mg/kg)	Cr intake from diet (mg/5 d)	Excretion of Cr in feces (mg/5 d)	Excretion of Cr in urine (mg/5 d)	Total Cr excretion (mg/5 d)	Cr digestibility (%)	Cr retention (%)
LFD-CrPic	5.55	0.475 ^{ab}	0.097 ^b	0.011	0.108 ^b	79.6 ^a	77.2 ^a
HFD-CrPic	6.60	0.513 ^a	0.224 ^a	0.009	0.233 ^a	56.3 ^b	54.5 ^b
LFD-CrNPs	5.30	0.442 ^b	0.260 ^a	0.015	0.276 ^a	40.9 ^c	37.5 ^c
HFD-CrNPs	6.90	0.498 ^a	0.227 ^a	0.012	0.239 ^a	53.6 ^b	51.3 ^b
SEM	0.22	0.017	0.012	0.001	0.012	2.6	2.2
Diet type (D)							
LFD	4.16 ^b	0.351	0.138	0.011	0.150	59.0	55.3
HFD	5.60 ^a	0.422	0.174	0.008	0.182	60.9	59.0
Cr addition (Cr)							
Cr-Pic	6.08	0.494	0.160	0.010 ^b	0.170	67.9	65.9
Cr-NPs	6.10	0.470	0.244	0.014 ^a	0.257	47.3	44.4
<i>p</i> -Value							
D effect	<0.001	<0.001	0.008	0.078	0.016	0.542	0.254
Cr effect	0.101	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Cr×D interaction	0.102	<0.001	<0.001	0.924	<0.001	<0.001	<0.001

The LFD-CrPic group was fed a standard low-fat diet with supplementation of chromium picolinate; the HFD-CrPic group was subjected to a high-fat diet with chromium picolinate supplementation; the LFD-CrNPs group was fed a standard low-fat diet with supplementation of chromium nanoparticles; the HFD-CrNPs group was fed a high-fat diet with nanoparticle chromium supplementation. The amount of chromium administered to each rat was 0.3 mg/kg body weight. SEM, standard error of the mean ($n=48$). ^{ab}Mean values within a column with unlike superscript letters differ significantly ($p<0.05$); differences among the groups (LFD-CrPic, HFD-CrPic, LFD-CrNPs, HFD-CrNPs) are indicated with superscripts only in the case of a statistically significant interaction Cr×D ($p<0.05$). The Cr intake from the diet was the same as total Cr intake (tap water provided to rats contained no Cr).

and Cr retention ($p<0.001$). The nature of the Cr×D interaction for fecal and total Cr excretion was in significantly lower amounts of Cr removed from the body, mainly *via* the fecal route, in the rats administered LFD-CrPic as compared to the remaining three dietary treatments ($p<0.05$ vs. HFD-CrPic, LFD-CrNPs, and HFD-CrNPs). The Cr×D interaction showed that the highest percentage of Cr digestibility and retention indices followed the dietary treatments with LFD-CrPic, while the lowest values of these indices were noted in the rats fed LFD-CrNPs (in both cases $p<0.05$ vs. all other groups). It has been reported that Cr nanoparticles are better absorbed from the gastrointestinal tract than their organic counterparts [Stepniowska *et al.*, 2022]. Indeed, in the present study, CrNPs were well absorbed in the intestine but at the same time that Cr form was not efficiently retained in the body's tissues and organs, as indicated by considerably diminished Cr retention (utilization) percentage. That process was clearly depicted under the standard low-fat dietary treatment by the highest and lowest retention values for CrPic and CrNPs, respectively. The addition of chromium in the form of CrPic to the high-fat diet resulted in decreased digestibility and retention of Cr in the rats, which corroborates our previous findings on the effect of dietary high-fat environment on the mineral utilization in the body [Stepniowska *et al.*, 2022]. Chromium picolinate has been shown to exhibit hydrophobic properties and, therefore, to be easily absorbed from the gastrointestinal tract in comparison to other forms

of Cr, nicotinate or chloride, available in popular mineral supplements [DiSilvestro & Dy, 2007]. Moreover, it has been found relatively stable in human gastric juice for over three hours, requiring a high concentration of acid (0.1 M) to break the bonds between Cr and picolinic acid [Lamson & Plaza, 2002]. The relatively high stability of chromium picolinate may also partly explain the lesser excretion of dietary CrPic from the rat's body as compared to the novel dietary form of chromium, *i.e.* CrNPs. In the present experiment, regardless of diet type, a greater urinal Cr excretion followed the dietary treatment with CrNPs vs. rats administered dietary CrPic (Table 2). Wang *et al.* [2012], who administered Cr in the form of CrPic or CrNPs at a dietary dose of 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to pigs, did not observe different fecal and urinal excretion pattern between those two forms of chromium. In turn, Stepniowska *et al.* [2022] noted a similar amount of chromium excreted with urine in rats fed diets supplemented with different chromium forms, *i.e.* picolinate, chromium-methionine, and as nanoparticles. At the same time, the rats fed diets with Cr nanoparticles excreted considerably more Cr in comparison to the animals subjected to dietary treatments with chromium picolinate or chromium-methionine.

The dietary treatments tested, *i.e.* HFD or LFD with the addition of Cr in the form of CrNPs or CrPic, did not differ among each other with respect to the Cr accumulation in the brain, spleen, kidney, liver, bones, and muscle of rats (Table 3). Jamal *et al.* [1991] observed that Cr was easily

TABLE 3. Chromium content in selected tissues of rats fed experimental diets ($\mu\text{g/g}$).

	Brain	Spleen	Kidney	Liver	Bones	Muscle
LFD-CrPic	0.133	0.563	1.03	0.438	0.311	0.169
HFD-CrPic	0.131	0.560	1.03	0.448	0.310	0.166
LFD-CrNPs	0.133	0.564	1.03	0.439	0.313	0.168
HFD-CrNPs	0.130	0.562	1.04	0.439	0.311	0.169
SEM	0.001	0.002	0.004	0.002	0.001	0.001
Diet type (D)						
LFD	0.132	0.564	1.03	0.440	0.312	0.169
HFD	0.130	0.560	1.03	0.443	0.310	0.167
Cr addition (Cr)						
Cr-Pic	0.132	0.561	1.03	0.443	0.310	0.167
Cr-NPs	0.131	0.563	1.03	0.439	0.312	0.169
<i>p</i> -Value						
D effect	0.219	0.376	0.870	0.540	0.106	0.331
Cr effect	0.950	0.938	0.917	0.718	0.499	0.670
Cr×D interaction	0.938	0.965	0.525	0.584	0.491	0.235

The LFD-CrPic group was fed a standard low-fat diet with supplementation of chromium picolinate; the HFD-CrPic group was subjected to a high-fat diet with chromium picolinate supplementation; the LFD-CrNPs group was fed a standard low-fat diet with supplementation of chromium nanoparticles; the HFD-CrNPs group was fed a high-fat diet with nanoparticle chromium supplementation. The amount of chromium administered to each rat was 0.3 mg/kg body weight. SEM, standard error of the mean ($n=48$).

accumulated in the kidneys of chickens fed diets containing potassium chromate. In our previous study on Wistar rats subjected to dietary treatments with nano-copper, those small nanoparticles were accumulated in the brain tissue, while such an effect was not observed in the case of CuCO_3 added to a mineral mixture [Ognik *et al.*, 2020]. An interesting observation was made by Staniek [2019] in female rats fed diets containing low (1 mg/kg), medium (50 mg/kg) and high (500 mg/kg) contents of chromium(III) without (recommended level 45 mg/kg) or with dietary excess (180 mg/kg) of iron. The author scrutinized the effects of the aforementioned treatments on Cu and Zn status in laboratory animals and found decreased Zn contents in the liver, spleen, and kidneys followed Cr(III) addition, especially when Cr(III) was provided at higher dosages. It was quite surprising that there was no interaction between the dietary chromium and the excessive supply of iron on the Cu and Zn status in the rat organism. The two-way ANOVA showed that, irrespective of the dietary additional Cr form, the HFD treatment resulted in a decrease in blood plasma Ca concentration ($p<0.05$ vs. LFD; Table 4). A significant Cr×D interaction was observed with respect to the plasma levels of Zn ($p=0.008$), Cu ($p=0.001$), P ($p=0.024$), and Fe ($p=0.014$). In the case of plasma Zn, Cu, and P concentrations, the nature of the interaction was that the LFD-CrPic group excelled significantly the HFD-CrPic one and such differences were not observed between both dietary CrNPs counterparts. Apart from the aforementioned differences between LFD-CrPic and HFD-CrPic groups, the latter animals had additionally a significantly

lower plasma Cu level than both CrNPs groups and a lower plasma P level than the LFD-CrNPs rats. The Cr×D effect showed the lowest plasma Fe concentration in the rats administered HFD-CrNPs in comparison to all other groups.

It has been reported that different dietary doses and forms of additional chromium may further affect the retention and tissue distribution of other macro- and microelements [Chang *et al.*, 1992; Dogukan *et al.*, 2009; Staniek *et al.*, 2013]. It should be noted that those effects of dietary chromium might be modulated by the ingested diet type. Indeed, in the present study, the HFD considerably diminished the plasma Ca level compared to LFD. It has been reported that long-term consumption of diets dense in energy derived from fats resulted in reduced gastrointestinal Ca absorption by creating hardly soluble Ca soaps in the intestinal contents [Wang *et al.*, 2016]. In addition, the ingestion of a high-fat diet may reduce the expression of genes related to calcium transport, *i.e.* calbindin-D9K, plasma membrane calcium ATPase (PMCA1b), Na-Ca exchanger [Xiao *et al.*, 2010]. High-fat diets, which are typically high in saturated fatty acids, have been shown to negatively affect bone mineral density in growing rats [Macri *et al.*, 2012]. McCarty [1995] observed that depressed excretion of calcium and hydroxyproline in older (postmenopausal) women followed the supplementary consumption of chromium in the form of picolinate and that this effect might be the cause for elevated bone resorption processes in those patients. The body's calcium management is closely related to the metabolism of phosphorus. The present experiment showed that blood plasma P concentration was substantially ($p<0.05$)

TABLE 4. Concentration of selected minerals in blood plasma of rats fed experimental diets.

	Zn (μM)	Cu (μM)	Mg (mM)	Ca (mM)	P (mM)	Fe (μM)
LFD-CrPic	69.9 ^a	15.7 ^a	0.549	2.26	1.30 ^a	2.73 ^a
HFD-CrPic	60.5 ^b	13.6 ^b	0.558	2.31	1.12 ^b	2.86 ^a
LFD-CrNPs	65.1 ^{ab}	16.0 ^a	0.604	2.32	1.35 ^a	2.43 ^a
HFD-CrNPs	64.4 ^{ab}	16.2 ^a	0.561	2.17	1.17 ^{ab}	1.41 ^b
SEM	1.2	0.6	0.007	0.03	0.02	0.11
Diet type (D)						
LFD	63.7	16.9	0.563	2.33 ^a	1.26	2.83
HFD	63.1	18.6	0.550	2.21 ^b	1.16	2.19
Cr addition (Cr)						
Cr-Pic	65.2	14.7	0.554	2.29	1.21	2.80
Cr-NPs	64.8	16.1	0.583	2.25	1.26	1.92
<i>p</i> -Value						
D effect	0.785	0.085	0.364	0.026	0.024	<0.001
Cr effect	0.136	<0.001	0.121	0.825	0.249	<0.001
Cr×D interaction	0.008	0.001	0.298	0.064	0.024	0.014

The LFD-CrPic group was fed a standard low-fat diet with supplementation of chromium picolinate; the HFD-CrPic group was subjected to a high-fat diet with chromium picolinate supplementation; the LFD-CrNPs group was fed a standard low-fat diet with supplementation of chromium nanoparticles; the HFD-CrNPs group was fed a high-fat diet with nanoparticle chromium supplementation. The amount of chromium administered to each rat was 0.3 mg/kg body weight. SEM, standard error of the mean ($n=48$). ^{ab}Mean values within a column with unlike superscript letters differ significantly ($p<0.05$); differences among the groups (LFD-CrPic, HFD-CrPic, LFD-CrNPs, HFD-CrNPs) are indicated with superscripts only in the case of a statistically significant interaction Cr×D ($p<0.05$).

decreased in the rats fed the high-fat diet supplemented with CrPic as compared not only to the rats fed the LFD-CrPic but also to those administered LFD-CrNPs. Our recent research on growing rats revealed blood depletion of Ca, P, Mg, and Zn under the treatment with a diet rich in saturated fats (lard) [Stepniowska *et al.*, 2022]. Interestingly, among three sources of additional chromium (chromium picolinate, chromium methionine, chromium nanoparticles) analyzed in that study, the greatest depletion effect of blood P concentration was upon Cr picolinate and the lowest one (insignificant compared to the control non-supplemented group) when the chromium-methionine was applied. The aforementioned effect should be ascribed to the lower consumption of a high-energy diet and elevated P fecal excretion in rats fed HFD [Stepniowska *et al.*, 2022]. Nevertheless, additional research is needed in order to explain the exact mechanism of that phenomenon. Our previous work on growing chickens revealed that Cr picolinate added to a diet at 3 mg/kg, but not at 6 mg/kg dietary dose, significantly reduced blood plasma P concentration as compared to the control non-supplemented group [Stepniowska *et al.*, 2020].

It has been reported that, when ingested, minerals (Cr and Fe) contest over transferrin as a transport protein in the metabolic pathways [Quarles *et al.*, 2010]. A study by Sun *et al.* [1999] showed that the form of dietary Cr seemed to be of paramount importance in its final effects on Fe metabolism. In that study, the dietary addition of $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ had no effect on the hepatic

content of Fe in rats, while the dietary LMWCr did otherwise and caused a drop in liver Fe content. The mutual action of Cr and Fe in the body as well as their metabolism might be affected by different agents, *e.g.* the physiological state of tested animals as well as the physical and chemical structure of Cr added to a diet. In our research, a considerable decrease in blood plasma Fe concentration followed the dietary application of CrNPs to HFD, and that effect was noted compared to all other three dietary treatments. It is well known that the blood Fe concentration largely depends on its absorption rate in the duodenum and that this element is absorbed into enterocytes mainly by divalent metal transporter 1 (DMT1) [Szabo *et al.*, 2021]. According to Jiang *et al.* [2018], DMT1 levels might be reduced significantly in the duodenum of rats following the feeding regimen on diets rich in saturated fats, pointing at DMT1 as the factor reducing duodenal iron absorption. In our very recent work, the rats receiving dietary chromium nanoparticles had a higher iron blood concentration compared to the animals administered chromium in the picolinate form, irrespective of low- or high-fat dietary regimen [Stepniowska *et al.*, 2022]. The difference in Fe blood concentration in relation to the present work was probably due to the fact that the rats in the previous study were younger and not subjected to the preliminary high-fat dietary feeding period. In addition, in the present study, a higher dietary intake of Cr was reported in the rats from the HFD-CrNPs group than in those from the LFD-CrNPs group (Table 4). Iron and chromium(III) share the transportation route to

the tissues *via* a similar vehicle, namely transferrin protein consisting of two C and N lobes. The binding of Fe(III) to the former lobe is about 20 times higher than to the latter one. Deng *et al.* [2016] observed that Cr(III) distracted two Fe(III) binding sites of apotransferrin. It may be speculated that in the case of relatively high dietary supplementation of Cr, as in the present experiment, the binding sites for Fe in transportation and gripping proteins might be taken by chromium. Such possibilities of the diminishing effects of dietary chromium on the potency of transferrin and apotransferrin to capture Fe(III) have been proposed by other authors [Quarles *et al.*, 2011; Staniek & Krejpcio, 2017; Vincent & Love, 2012]. Considering blood Ca concentration, its chronically low level is considered as a potent detrimental factor leading to impeded muscle contractility [Moe, 2005], while a decreased Fe pool in the body may impair the redox status and erythropoiesis intensification [Robach *et al.*, 2007]. The available literature shows some discrepancies with regard to mutual iron and chromium competition, like in the case of transporting proteins [Quarles *et al.*, 2010, 2011; Vincent & Love 2012] or possible synergistic effect of those minerals against anemia [Angelova *et al.*, 2014]. But there is no doubt that the level of iron in the internal tissues, including blood, plays the main/important role in the metabolic fate of other trace elements, *e.g.* Zn and Cu. Our research showed that feeding rats with the HFD-CrPic compared to LFD-CrPic resulted in decreased levels of Cu and Zn in their blood plasma and that this effect was not dependent on the Fe blood concentration (Table 4). According to de Luis *et al.* [2013], obese patients suffer serum zinc depletion in comparison to the consumers with normal BW mass. A recent study on mild-diabetic rats showed that dietary addition of chromium (0.75 mg/kg BW) as Cr(III)-glycinate or Cr(III)-picolinate redressed the Cu/Zn balance in blood and selected tissues, *i.e.* kidneys and heart [Król *et al.*, 2020].

Experiments conducted on laboratory animals with undisturbed [Anderson *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1992; Zha *et al.*, 2007] and disturbed metabolism [Król & Krejpcio, 2010] have shown that kidneys are very sensitive organs to Cr dietary supplementation. In the present study, there were no side-effects in kidneys followed the dietary treatments with 0.3 mg/kg BW of Cr in the form of picolinate or nanoparticles (Table 3). It should be stressed that a simple comparison between different research could lead to invalid conclusions, and thus a deep insight in the subject must be done before the final claim would be drawn. It is not possible to determine the actual metabolic action of dietary chromium without considering differences in Cr administration time, dose, and form, and health condition in consumers (animals and humans). It should be noted that our study found no interactive effect of feeding rats with a low-fat or high-fat diet with the addition of CrPic or CrNPs chromium at a dose of 0.3 mg/kg BW on the accumulation of this element in internal organs. The results achieved with other type of nanoparticles presented by our research team showed that, in comparison to the commonly used CuCO₃, dietary copper nanoparticles to a greater extent were absorbed from the rat intestine, heavily accumulated in the brain tissue, and at the higher dose (6.5 vs. 3.25 mg/kg) caused damages to the rat liver [Cholewińska *et al.*, 2018]. There is no doubt that more research is needed

regarding dietary nanoparticle use in humans and caution is suggested when providing to public pros about a “new promising” source of trace elements in our diet.

CONCLUSIONS

Irrespective of the diet type, *i.e.* high-fat or low-fat, an enhanced excretion of chromium from the rat's body followed the dietary addition of CrNPs as compared to CrPic. It is worth noting that both sources of additional dietary chromium did not cause its accumulation in the analyzed internal organs, *e.g.* brain, spleen, liver, thigh bone, and kidneys. It should be stressed that both CrPic and CrNPs negatively modulated the mineral status of blood plasma when added to the high-fat diet, namely: the dietary CrPic reduced Zn, Cu and P concentrations while CrNPs diminished plasma Fe level.

RESEARCH FUNDING

This work was supported by the National Science Centre, Grant No. 2020/39/B/NZ9/00674.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no competing interests.

ORCID IDs

B. Fotschki <https://orcid.org/0000-0002-9727-7481>

J. Fotschki <https://orcid.org/0000-0002-0116-0909>

J. Juśkiewicz <https://orcid.org/0000-0003-0068-5970>

K. Ognik <https://orcid.org/0000-0003-4393-4092>

A. Stepińska <https://orcid.org/0000-0003-2424-8935>

K. Tutaj <https://orcid.org/0000-0002-3742-3715>

REFERENCES

- Anderson, R.A., Bryden, N.A., Polansky, M.M., Gautschi, K. (1996). Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 9(1), 11–25. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-670X\(199607\)9:1%3C11::AID-JTRA2%3E3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-670X(199607)9:1%3C11::AID-JTRA2%3E3.0.CO;2-K)
- Angelova, M.G., Petkova-Marinova, T.V., Pogorielov, M.V., Loboda, A.N., Nedkova-Kolarova, V.N., Bozhinova, A.N. (2014). Trace element status (iron, zinc, copper, chromium, cobalt, and nickel) in iron deficiency anaemia of children under 3 years. *Anemia*, 2014, art. no. 718089. <https://doi.org/10.1155/2014/718089>
- Chang, X., Mowat, D.N., Spiers, G.A. (1992). Carcass characteristics and tissue-mineral contents of steers fed supplemental chromium. *Canadian Journal of Animal Science*, 72(3), 663–668. <https://doi.org/10.4141/cjas92-077>
- Cholewińska, E., Ognik, K., Fotschki, B., Zduńczyk, Z., Juśkiewicz, J. (2018). Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS ONE*, 13(5), art. no. e0197083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197083>

5. Davis, C.M., Vincent, J.B. (1997). Chromium in carbohydrate and lipid metabolism. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2, 675–679.
<https://doi.org/10.1007/s007750050183>
6. de Luis, D.A., Pacheco, D., Izaola, O., Terroba, M.C., Cuellar, L., Cabezas, G. (2013). Micronutrient status in morbidly obese women before bariatric surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 9(2), 323–327.
<https://doi.org/10.1016/j.soard.2011.09.015>
7. Deng, G., Dyroff, S.L., Lockart, M., Bowman, M.K., Vincent, J.B. (2016). The effects of the glycation of transferrin on chromium binding and the transport and distribution of chromium *in vivo*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 164, 26–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.08.008>
8. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (2010). *Official Journal of the European Union*, L 276, 20.10.2010, pp. 33–79.
<http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
9. DiSilvestro, R.A., Dy, E. (2007). Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(2), 120–124.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.01.004>
10. Dogukan, A., Sahin, N., Tuzcu, M., Juturu, V., Orhan, C., Onderci, M., Komorowski, J., Sahin, K. (2009). The effects of chromium histidinate on mineral status of serum and tissue in fat-fed and streptozotocin-treated type II diabetic rats. *Biological Trace Elements Research*, 131, 124–132.
<https://doi.org/10.1007/s12011-009-8351-8>
11. Dworżański, W., Cholewińska, E., Fotschki, B., Juśkiewicz, J., Listos, P., Ognik, K. (2020). Assessment of DNA methylation and oxidative changes in the heart and brain of rats receiving a high-fat diet supplemented with various forms of chromium. *Animals*, 10(9), art. no. 1470.
<https://doi.org/10.3390/ani10091470>
12. Dworżański, W., Sembratowicz, I., Cholewińska, E., Tutaj, K., Fotschki, B., Juśkiewicz, J., Ognik, K. (2021). Effects of different chromium compounds on hematology and inflammatory cytokines in rats fed high-fat diet. *Frontiers in Immunology*, 12, art. no. 614000.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.614000>
13. EFSA. European Food Safety Authority (2014). Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA Journal*, 12(7), art. no. 3759.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3759>
14. Inanç, N., Uyanik, F., Sahin, H., Yaman, H., Erdem, O. (2006). Effects of chromium supplementation on body composition, leptin, ghrelin levels and selected biochemical parameters in obese women. *Trace Elements and Electrolytes*, 23, 128–133.
<https://doi.org/10.5414/TEP23128>
15. Jamal, Z.M., Vjekoslav, S., Jelena, P.G., Emil, S. (1991) Distribution of chromium in the internal organs of potassium chromate treated chicks. *Veterinary and Human Toxicology*, 33(3), 223–225.
PMID: 1858300
16. Jiang, S., Yan, K., Sun, B., Gao, S., Yang, X., Ni, Y., Ma, W., Zhao, R. (2018). Long-term high-fat diet decreases hepatic iron storage associated with suppressing TFR2 and ZIP14 expression in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(44), 11612–11621.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02974>
17. Król, E., Krejpcio, Z. (2010). Chromium(III) propionate complex supplementation improves carbohydrate metabolism in insulin resistance rat model. *Food Chemistry and Toxicology*, 48(10), 2791–2796.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.008>
18. Król, E., Krejpcio, Z., Iwanik, K. (2014). Supplementary chromium(III) propionate complex does not protect against insulin resistance in high-fat-fed rats. *Biological Trace Elements Research*, 157, 147–155.
<https://doi.org/10.1007%2Fs12011-013-9877-3>
19. Król, E., Krejpcio, Z., Okulicz, M., Śmigielska, H. (2020). Chromium(III) glycinate complex supplementation improves the blood glucose level and attenuates the tissular copper to zinc ratio in rats with mild hyperglycaemia. *Biological Trace Element Research*, 193, 185–194.
<https://doi.org/10.1007/s12011-019-01686-7>
20. Lamson, D.W., Plaza, S.M. (2002). The safety and efficacy of high-dose chromium. *Alternative Medicine Review*, 7(3), 218–235.
PMID: 12126463
21. Lindemann, M.D., Cromwell, G.L., Monegue, H.J., Purser, K.W. (2008). Effect of chromium source on tissue concentration of chromium in pigs. *Journal of Animal Science*, 86(11), 2971–2978.
<https://doi.org/10.2527/jas.2008-0888>
22. Lyons, T.P. (1994). Biotechnology in the feed industry: 1994 and beyond. In: *Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium, Biotechnology in the Feed Industry*. P. Lyons, K.A. Jacques (Eds.), Nottingham University Press, UK, pp. 1–50.
23. Macri, E.V., Gonzales Chaves, M.M., Rodriguez, P.N., Mandalunis, P., Zeni, S., Lifshitz, F., Friedman, S.M. (2012). High-fat diets affect energy and bone metabolism in growing rats. *European Journal of Nutrition*, 51, 399–406.
<https://doi.org/10.1007/s00394-011-0223-2>
24. McCarty, M.F. (1995). Anabolic effects of insulin on bone suggest a role for chromium picolinate in preservation of bone density. *Medical Hypotheses*, 45(3), 241–246.
[https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90112-4](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90112-4)
25. Meli, R., Mattace Raso, G., Irace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., Pagano, T.B., Calignano, A., Colonna, A., Santamaria, R. (2013). High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PLoS ONE*, 8(6), art. no. e66570.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066570>
26. Moe, S.M. (2005). Disorders of calcium, phosphorus, and magnesium. *American Journal of Kidney Diseases*, 45(1), 213–218.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.10.014>
27. Muller, L., Baldwin, K., Barbacci, D.C., Jackson, S.N., Roux, A., Balaban, C.D., Brinson, B.E., McCully, M.I., Lewis, E.K., Schultz, J.A., Woods, A.S. (2017). Laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of endogenous lipids from rat brain tissue implanted with silver nanoparticles. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(8), 1716–1728.
<https://doi.org/10.1007%2Fs13361-017-1665-4>
28. Nascimento, A.R., Machado, M., de Jesus, N., Gomes, F., Lessa, M.A., Bonomo, I.T., Tibiriçá, E. (2013). Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity*, 21(10), 2046–2054.
<https://doi.org/10.1002/oby.20358>

29. Ognik, K., Cholewińska, E., Tutaj, K., Cendrowska-Pinkosz, M., Dworżański, W., Dworżańska, A., Juśkiewicz, J. (2020). The effect of the source and dosage of dietary Cu on redox status in rat tissues. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(1), 352–361.
<https://doi.org/10.1111/jpn.13207>
30. Ognik, K., Dworżański, W., Sembratowicz, I., Fotschki, B., Cholewińska, E., Listos, P., Juśkiewicz, J. (2021). The effect of the high-fat diet supplemented with various forms of chromium on rats body composition, liver metabolism and organ histology Cr in liver metabolism and histology of selected organs. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 64, art. no. 126705.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126705>
31. Orhan, C., Kucuk, O., Tuzcu, M., Sahin, N., Komorowski, J.R., Sahin, K. (2019). Effect of supplementing chromium histidinate and picolinate complexes along with biotin on insulin sensitivity and related metabolic indices in rats fed a high-fat diet. *Food Science & Nutrition*, 7(1), 183–194.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.851>
32. Pechova, A., Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina*, 52 (1), 1–18.
<https://doi.org/10.17221/2010-VETMED>
33. Prescha, A., Krzysik, M., Zabłocka-Słowińska, K., Grajeta, H. (2014). Effects of exposure to dietary chromium on tissue mineral contents in rats fed diets with fiber. *Biological Trace Elements Research*, 159, 325–331.
<https://doi.org/10.1007/s12011-014-9973-z>
34. Qi, Y., Zhang, Z., Liu, S., Aluo, Z., Zhang, L., Yu, L., Li, Y., Song, Z., Zhou, L. (2020). Zinc supplementation alleviates lipid and glucose metabolic disorders induced by a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18), 5189–5200.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01103>
35. Quarles, C.D., Brumaghim, J.L., Marcus, R.K. (2010). Instrumental comparison of the determination of Cr³⁺ uptake by human transferrin. *Metallomics*, 2(12), 792–799.
<https://doi.org/10.1039/c0mt00032a>
36. Quarles, C.D., Marcus, R.K., Brumaghim, J.L. (2011). Competitive binding of Fe³⁺, Cr³⁺, and Ni²⁺ to transferrin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16, 913–921.
<https://doi.org/10.1007/s00775-011-0792-9>
37. Reeves, P.G. (1997). Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *Journal of Nutrition*, 127(5), 838S–841S.
<https://doi.org/10.1093/jn/127.5.838S>
38. Robach, P., Cairo, C., Gelfi, C., Bernuzzi, F., Pilegaard, H., Vigano, A., Santambrogio, P., Cerretelli, P., Calbet, J.A.L., Moutereau, S., Lundby, C. (2007). Strong iron demand during hypoxia-induced erythropoiesis is associated with down-regulation of iron-related proteins and myoglobin in human skeletal muscle. *Blood*, 109(11), 4724–4731.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040006>
39. Şahin, K., Şahin, N., Güler, T., Ertaş, O.N. (2001). The effect of supplemental dietary chromium on performance, some blood parameters and tissue chromium contents of rabbits. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25, 217–221.
40. Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Agca, C.A., Sahin, N., Guvenc, M., Krejpcio, Z., Staniek, H., Hayirli, A. (2011). The effects of chromium complex and level on glucose metabolism and memory acquisition in rats fed high-fat diet. *Biological Trace Elements Research*, 143, 1018–1030.
<https://doi.org/10.1007/s12011-010-8905-9>
41. Staniek, H. (2019). The combined effects of Cr(III) propionate complex supplementation and iron excess on copper and zinc status in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 53, 49–54.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.01.011>
42. Staniek, H., Krejpcio, Z. (2017). The effects of supplementary Cr³⁺ (chromium (III) propionate complex) on the mineral status in healthy female rats. *Biological Trace Elements Research*, 180, 90–99.
<https://doi.org/10.1007/s12011-017-0985-3>
43. Staniek, H., Rhodes, N.R., Di Bona, K.R., Deng, G., Love, S.T., Pledger, L.A., Blount, J., Gomberg, E., Grappe, F., Cernosek, C., Peoples, B., Rasco, J.F., Krejpcio Z., Vincent, J.B. (2013). Comparison of tissue metal concentrations in Zucker lean, Zucker obese, and Zucker diabetic fatty rats and the effects of chromium supplementation on tissue metal concentrations. *Biological Trace Elements Research*, 151, 373–383.
<https://doi.org/10.1007/s12011-012-9565-8>
44. Stearns, D.M. (2000). Is chromium a trace essential metal? *Biofactors*, 11(3), 149–162.
<https://doi.org/10.1002/biof.5520110301>
45. Stepniowska, A., Tutaj, K., Drażbo, A., Kozłowski, K., Ognik, K., Jankowski, J. (2020). Estimated intestinal absorption of phosphorus and its deposition in chosen tissues, bones and feathers of chickens receiving chromium picolinate or chromium nanoparticles in diet. *PLoS ONE*, 15(11), art. no. e0242820.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242820>
46. Stepniowska, A., Tutaj, K., Juśkiewicz, J., Ognik, K. (2022). Effect of a high-fat diet and chromium on hormones level and Cr retention in rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, 45, 527–535.
<https://doi.org/10.1007/s40618-021-01677-3>
47. Suksomboon, N., Poolsup, N., Yuwanakorn, A. (2014). Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of chromium supplementation in diabetes. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 39(3), 292–306.
<https://doi.org/10.1111/jcpt.12147>
48. Sun, Y., Mallya, K., Ramirez, J., Vincent, J.B. (1999). The biomimetic [Cr₃O(O₂CCH₂CH₃)₆(H₂O)₃]⁺ decreases cholesterol and triglycerides in rats: towards chromium-containing therapeutics. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4, 838–845.
<https://doi.org/10.1007/s007750050357>
49. Szabo, R., Bodolea, C., Mocan, T. (2021). Iron, copper, and zinc homeostasis: Physiology, physiopathology, and nanomediated applications. *Nanomaterials*, 11, art. no. 2958.
<https://doi.org/10.3390/nano11112958>
50. Tuzcu, M., Sahin, N., Orhan, C., Agca, C.A., Akdemir, F., Tuzcu, Z., Komorowski, J., Sahin, K. (2011). Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutrition & Metabolism*, 8, art. no. 28.
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-28>
51. Vincent, J.B., Love, S. (2012). The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica Biophysica Acta*, 1820(3), 362–378.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.003>
52. Vlizlo, V., Iskra, R., Maksymowych, I., Lis, M.W., Niedziółka, J.W. (2014). Disturbance of antioxidant protection and natural resis-

- tance factors in rats with different availabilities of trivalent chromium. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 38(2), 138–144. <https://doi.org/10.3906/vet-1305-44>
53. Wang, Y., Dellatore, P., Douard, V., Qin, L., Watford, M., Ferraris, R.P., Lin, T., Shapses, S.A. (2016). High fat diet enriched with saturated, but not monounsaturated fatty acids adversely affects femur, and both diets increase calcium absorption in older female mice. *Nutrition Research*, 36(7), 742–750. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.03.002>
54. Wang, M.Q., Li, H., He, Y.D., Wang, C., Tao, W.J., Du, Y.J. (2012). Efficacy of dietary chromium (III) supplementation on tissue chromium deposition in finishing pigs. *Biological Trace Element Research*, 148, 316–321. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9369-x>
55. Xiao, Y., Cui, J., Shi, Y.H., Sun, J., Wang, Z.P., Le, G.W. (2010). Effects of duodenal redox status on calcium absorption and related genes expression in high-fat diet-fed mice. *Nutrition*, 26(11–12), 1188–1194. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.11.021>
56. Yoshida, M., Hatakeyama, E., Hosomi, R., Kanda, S., Nishiyama, T., Fukunaga, K. (2010). Tissue accumulation and urinary excretion of chromium in rats fed diets containing graded levels of chromium chloride or chromium picolinate. *Journal of Toxicological Sciences*, 35(4), 485–491. <https://doi.org/10.2131/jts.35.485>
57. Zha, L.Y., Wang, M.Q., Xu, Z.R., Gu, L.Y. (2007). Efficacy of chromium(III) supplementation on growth, body composition, serum parameters, and tissue chromium in rats. *Biological Trace Elements Research*, 119, 42–50. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0042-8>
58. Żary-Sikorska, E., Fotschki, B., Kosmala, M., Milala, J., Matusevicius, P., Rawicka, A., Juśkiewicz, J. (2021). Strawberry polyphenol-rich fraction can mitigate disorders in gastrointestinal tract and liver functions caused by a high-fructose diet in experimental rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 71(4), 423–440. <https://doi.org/10.31883/pjfn/143057>

RESEARCH ARTICLE

Estimated intestinal absorption of phosphorus and its deposition in chosen tissues, bones and feathers of chickens receiving chromium picolinate or chromium nanoparticles in diet

Anna Stępniewska^{1*}, Krzysztof Tutaj¹, Aleksandra Drażbo², Krzysztof Kozłowski², Katarzyna Ognik¹, Jan Jankowski²

1 Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland, **2** Department of Poultry Science, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland

* anna.stepniowska@up.lublin.pl



OPEN ACCESS

Citation: Stępniewska A, Tutaj K, Drażbo A, Kozłowski K, Ognik K, Jankowski J (2020) Estimated intestinal absorption of phosphorus and its deposition in chosen tissues, bones and feathers of chickens receiving chromium picolinate or chromium nanoparticles in diet. PLoS ONE 15(11): e0242820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242820>

Editor: Arda Yildirim, Tokat Gaziosmanpasa University, TURKEY

Received: May 20, 2020

Accepted: November 10, 2020

Published: November 25, 2020

Copyright: © 2020 Stępniewska et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: This research was supported by the Ministry of Science and Higher Education: University of Warmia and Mazury (no. 11.610.004-300) and University of Life Sciences in Lublin (no. ZKT/S/20/2019/ZIR).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The aim of the study was to determine whether the level and form of Cr in the diet of chickens influences its accumulation in tissues as well as intestinal absorption of P and its deposition in tissues. The experiment was carried out on 405 one-day-old male Ross 308 chickens that were randomly divided into five treatment groups. Control group was fed the diet without supplemental chromium; experimental groups were fed the diet with 3 or 6 mg/kg chromium picolinate (Cr-Pic) and with 3 or 6 mg/kg chromium nanoparticles (Cr-NP). Chromium was found to accumulate in the tissues of the ileum, liver, breast muscle, bones skin and in feathers of chickens. Chromium deposited in the ileum of chickens does not affect the ex vivo estimated intestinal absorption of P. The use of Cr in the diet of chickens carries the risk of lowering P levels in femur.

Introduction

Dietary chromium (Cr) affects birds physiology, improves carbohydrate and lipid metabolism, reduces stress responses, stimulates the immune systems, and above all can improve production results and reduce carcass fat [1–7]. Although Cr is not currently considered as essential trace element for poultry, researchers are increasingly investigating its potential to relieve heat stress. Moreover, commercial Cr-based preparations exhibiting this effect are already available among feed additives. Toxicity of Cr depends on its valance state, Cr(VI) is more toxic than Cr(III). However, according to Bagchi et al. [8] Cr(III) in high doses cause renal impairment, anemia, hemolysis, tissue edema, liver dysfunction; neuronal cell injury, enhanced production of hydroxyl radicals, chromosomal aberration, depletion of antioxidant enzymes, and DNA damage. Maximum Residue Limits (MRL) are established for residues of feed additives or veterinary medicines. Due to the lack of sufficient data for Cr(III), the MRL for tissues has not

been determined for its administration by either the oral or inhalation route [9]. There are no National Research Council (NRC) [10] recommendations for Cr in poultry, but this organization recommends 300 µg/kg of Cr in the diets of laboratory animals. The European Food Safety Authority (EFSA) [11] has not yet established maximum dosages for various forms of Cr, including nanoparticles. However, according to this organization using supplementation with Cr picolinate and yeast enriched with Cr in the amount of 0.8 mg Cr/kg of feed in poultry diet showed no effect on growth performance in chickens and turkeys [11]. The authors of various studies have supplemented the diet of poultry with chromium picolinate (Cr-Pic) in amounts from 200 to 4000 µg/kg and chromium nanoparticles (Cr-NP) in amounts from 200 to 1500 µg/kg, but as yet no toxic effect of these levels on the body has been confirmed [2, 6, 7].

Although numerous studies have established how Cr affects the metabolism, immunity, and growth performance of birds [2–4, 6], little is known about its accumulation in the intestines and other tissues, and especially about its effect on absorption of phosphorus in the enterocytes and its deposition in the tissues of chickens. Absorption of elements, including metal ions, in the small intestine depends on their chemical and physical form, but also on the presence of other substances in the diet, or on levels of certain hormones [12]. Chromium is probably absorbed in the enterocytes through channels transporting divalent metals such as iron, or via passive transport [12, 13]. The exact mechanism, however, is not yet known [11]. Chromium absorption has been shown to depend on its chemical form, i.e. Cr(VI) is better absorbed than Cr(III) [14]. Moreover, Cr in the form of complexes with organic ligands such as picolinate, propionate or amino acids (methionine, lysine, or histidine) is better absorbed in the gastrointestinal tract than Cr in the form of inorganic compounds such as CrCl₃ [15, 16]. In recent years, scientific research has been focused on the use of Cr in the form of nanoparticles in poultry feeding due to their small size and potential more effective absorption [7, 17, 18]. Due to the fact that Cr in an organic form is absorbed better than in an inorganic form, it seems interesting to determine how Cr in the form of nanoparticles is absorbed and deposited in the body compared to the organic form of this element. The form of phosphorus (P), on the other hand, has a completely different effect on its absorption than in the case of Cr. Birds best absorb P in inorganic forms such as monocalcium phosphate, while organic forms such as phytates are not absorbed and require prior hydrolysis, e.g. by phytases [19–22]. Phosphorus is an important component of nucleic acids and phospholipids, and is also a cofactor for many enzymes [19]. Furthermore, it plays an important role in maintaining osmotic and acid-base balance, in protein synthesis, and in bone mineralization. It is a key mediator of energy metabolism through ATP [15]. Therefore, P deficiency can disrupt numerous biochemical processes in the cell and thus adversely affect growth performance.

Since Cr(III) is a cation, while P is an anion, these elements are presumed not to compete for enterocyte transport proteins. Once absorbed, Cr, by promoting the secretion of certain hormones, e.g. PTH, corticosterone, insulin, and dopamine [3, 5, 23], may indirectly influence the absorption of phosphorus, and thus its content in the cell and tissues. PTH regulates calcium and phosphate metabolism. This hormone mobilizes Ca from bone by activation of osteoclasts, resulting in the resorption of bone. When Ca level in blood is low, PTH also decreases phosphate reabsorption at the proximal convoluted tubule. When Ca level in blood is high, PTH increases phosphate reabsorption in kidney. According to McCarty [24] Cr probably diminishes PTH's ability to activate osteoclasts. Chromium increase insulin activity in bone, which can inhibit bone resorption by blocking the effect of PTH on osteoblasts, and more particularly, by impeding the PTH-mediated activation of protein kinase C (PKC).

There are reports that Cr accumulates in some tissues [25–27] and modifies the Ca metabolism in the body (including bones), so there is a supposition that it may also modify P metabolism (such studies have not been conducted so far). Disruption of P metabolism may result in

deterioration of growth results, as a result of impaired deposition of this element in the bones as well as due to the dysfunction of some enzymes.

The aim of the study was to determine whether the form and level of Cr in the diet of chickens influences Cr accumulation in tissues as well as intestinal absorption of P and P deposition in tissues.

Materials and methods

Animals and diets

The experiment was carried out in a poultry house at the experimental facilities of the Department of Poultry Science, University of Warmia and Mazury, in Olsztyn, Poland. A total of 405 one-day-old male Ross 308 chickens were randomly divided into five groups, with nine replicates of nine birds each, and kept in cages. All birds had free access to feed and water. Each cage was equipped with nipple drinkers and a feeder that was manually filled on a daily basis. The heating and light program was in accordance with the Ross Broiler Management Manual [28]. All procedures involving handling the birds were performed by qualified veterinarians. No action involving pain or suffering was practiced, and all of the analyses were performed on samples collected post-mortem. The protocol for this study and the number of chickens used in this study were consistent with the regulations of the Local Committee for Experimentation on Animals (Olsztyn, Poland) and were performed in accordance with the principles of the European Union Directive 2010/63/EU for animal experiments and Polish Law on Animal Protection. The experimental procedure was approved by the Local Animal Experimentation Ethics Committee in Olsztyn (No. 30/2015).

The birds were fed a basal diet that was changed in two periods: starter (0–21 days) and grower/finisher (22–35 days) (Table 1). A control (C) group was fed the basal diet but without supplemental chromium. Experimental groups were fed basal diets supplemented with two levels of Cr (3 and 6 mg/kg) and two different Cr sources (Cr-picolinate–Cr-Pic and Cr-nanoparticles–Cr-NP). Four experimental diets were obtained: 3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic, 3 mg/kg Cr-NP and 6 mg/kg Cr-NP. Chromium metal nanoparticles (Cr-NP, purity 99.9%, 60–80 nm, spherical, specific surface area 6–8 m²/g, bulk density 0.15 g/cm³, true density 8.9 g/cm³) was purchased from SkySpring Nanomaterials (USA). Chromium(III) picolinate (purity > 98%) was purchased from Sigma-Aldrich Sp. z o.o. (Poznan, Poland). The experimental additives were added to the feed mixtures in the form of suspensions in rapeseed oil (0.5%) on top of feed. Control group received 0.5% rapeseed oil without any additives on top of feed. All diets were isocaloric and isonitrogenous, and contained similar amounts of major amino acids (including lysine, methionine with cysteine, and threonine), minerals (including calcium and available phosphorus), and vitamins.

The nutritional value of all experimental diets corresponded to the nutrient requirements of broiler chickens [28].

Sample collection

At 35 days of age, nine birds representing the average body weight of each group were selected, tagged, and fasted for 8 h. Blood samples were taken from the same nine birds from each group (one bird for each replication). Immediately after collection, blood samples were aliquoted into test tubes containing heparin as an anticoagulant. The samples were centrifuged for 15 min at 3000g and 4°C, and the obtained plasma was stored at –20°C until analysis.

Then, the same nine broilers per group (one bird representing the average body weight per pen) were killed at a slaughterhouse. The birds (without being transported) were electrically stunned (400 mA, 350 Hz), hung on a shackle line and exsanguinated by a unilateral neck cut

severing the right carotid artery and jugular vein. After a 3-min bleeding period, the birds were scalded at 61 °C for 60 s, defeathered in a rotary drum picker for 25 s, and manually eviscerated. Following evisceration, whole carcasses were stored at 4 °C and hand-deboned on a cone 24 h post mortem. The carcasses were dissected, and samples of the ileum, liver, breast muscle, femur, skin, and feathers were collected. Ileum samples were used for analysis of P absorption.

Ex vivo phosphorus absorption

Phosphorus absorption was tested using the *ex vivo* gastrointestinal sac technique described by Ognik et al. [29]. Immediately following removal of the small intestines, they were gently emptied of their contents and rinsed with physiological saline solution to remove feed residue. The anterior part of the intestine (about 20 cm of the ileum) was taken from nine birds in each experimental group and divided into a control segment (C) and experimental segments (E1 and E2). The jejunum area is easy to determine, so the ileum was collected at the border of the jejunum and ileum. Each of the 9 gut segments was divided into 3 smaller segments resulting an equal number of 9 gut segments for C, E1 and E2. Control segment was used for determination of Cr and P in ileum walls. Segments E1 and E2 were used to gut sacs preparation. The gut sacs were injected with 5 mL of a basal solution containing 4.8 g/L (E1) and 4.5 g/L of P (E2), depending on the period, in the form of $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ (absorption of P in phosphates is very often differentiated from 65 to 90% [30]): the amount of P in the basal solution was chosen based on available P content in the diet, i.e. 4.8 g/kg during the period of 1–21 d and 4.5 g/kg during the period of 22–35 d (Table 1). The sacs prepared in this manner were incubated for 2 h in a 100 mL serosal bath (0.9% NaCl) in a CO_2 incubator at 37 °C. Following incubation the sacs were rinsed with physiological saline and then cut open and dried at 60 °C. For chemical analyzes, samples were taken in 3 replications from each segment (C, E1, E2).

Determination of P and Cr content

The dried tissue samples for P determination were weighed to determine their dry weight. Then they were incinerated in a muffle furnace at 620 °C for 5 h, and the ash was dissolved in 5 mL of 6 M HCl and diluted to 50 mL. Phosphorus contents in burnt tissue samples and in serosal bath were determined by a colorimetric assay measuring the reaction of phosphate ions with molybdate complexes in the presence of ascorbic acid solution [31]. Absorbance was measured in a spectrophotometer Thermo Scientific Genesis 20 at 660 nm. The plasma content of P was measured using an automatic biochemical analyser (Plasma Diagnostic Instruments Horiba, Kyoto, Japan).

For sample preparation for Cr determination, a 10 mL volume of concentrated HNO_3 (Sigma Aldrich) was poured over weighed portions (usually 500 ± 1 mg of each sample), which were then subjected to wet ashing. Mineralization was carried out in a Microwave Digestion System in Teflon vials (DAP 100), with optimal temperature and pressure applied to each individual sample, monitored throughout the acid digestion procedure (Bergh of Speedwave). Mineralization was performed according to the following scheme: 15 min with the temperature rising from room temperature up to 140 °C, 5 min at a stable temperature of 140 °C, 5 min with the temperature rising from 140 °C up to 170 °C, 15 min at 170 °C and finally cooling down to room temperature (variable time). The pressure over the entire mineralisation process did not exceed 12 bar (1.2 MPa). A clear solution was obtained when the mineralisation process was completed. Next, the solution was cooled to room temperature and transferred to a 50 mL volumetric flask filled with demineralised water (ELGA Pure Lab Classic) to the 50 mL mark. Total concentrations of Cr in feed mixtures, plasma, ileum, liver, breast muscle, skin,

Table 1. Composition and nutrient density of diets.

Components, g/kg	Starter	Grower/Finisher
	days 1–21	days 22–35
Maize	200.0	200.0
Soybean meal	336.5	282.4
Wheat	383.4	421.4
Soybean oil	39.0	56.1
Salt	3.3	3.3
Limestone	11.9	11.6
Monocalcium phosphate	14.4	13.3
DL-Methionine	3.1	2.8
L-Lysine HCL	2.7	3.1
L-Threonine	0.7	1.0
Vitamins + trace minerals ¹	5.0	5.0
Calculated nutrient density, g/kg		
Crude protein	220.0	200.0
Lysine	13.0	12.0
Methionine	6.2	5.7
Met. + Cys.	10.0	9.2
Threonine	8.5	8.0
Calcium	9.5	9.0
Available phosphorus	4.8	4.5
ME, kcal/kg	2950	3100
Amount of Cr added to feed	Analysed content of Cr, mg/kg	
0	0.86	0.83
3 mg/kg Cr-Pic ²	3.90	3.36
6 mg/kg Cr-Pic	6.71	6.20
3 mg/kg Cr-NP	3.85	3.87
6 mg/kg Cr-NP	6.49	6.08

¹ Provided per kilogram of diet: days 1–21: vit. A, 15,000 IU; vit. D₃, 5000 IU; vit. E, 112 IU; vit. K₃, 4 mg; vit. B₁, 3 mg; vit. B₂, 8 mg; vitamin B₆, 5 mg; vit. B₁₂, 16 mg; folic acid, 2 mg; biotin, 0.2 mg; nicotinic acid, 60 mg; calcium pantothenate, 18 mg; choline, 1.8 g; Mn, 100 mg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.15 mg; days 22–35: vit. A, 12,000 IU; vit. D₃, 5000 IU; vit. E, 75 IU; vit. K₃, 2 mg; vit. B₁, 2 mg; vit. B₂, 6 mg; vit. B₆, 4 mg; vit. B₁₂, 16 mg; folic acid, 1.75 mg; biotin, 0.05 mg; nicotinic acid, 60 mg; calcium pantothenate, 18 mg; choline, 1.6 g; Mn, 100 mg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.15 mg

²Cr-Pic–chromium picolinate; Cr-NP–chromium nanoparticles

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242820.t001>

thigh bones, and feathers were determined with an ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer) from Varian Inc., Palo Alto, CA, USA.

Cr intake was calculated based on DFI, BW and Cr content in feed and the equation:

$$Cr\ intake = \frac{DFI\ (1 - 14\ d) * Cr\ content\ in\ feed}{BW\ (14\ d)} + \frac{DFI\ (15 - 35\ d) * Cr\ content\ in\ feed}{BW\ (35\ d)}$$

Statistical analysis

The Statistica software package version 13.1 (Statsoft Inc., 2016) was used to determine whether variables differed between treatment groups. Values below the limit of quantification (LOQ) in the statistical analysis were set as “0”. The comparison of control group vs all other groups was performed by planned contrast analysis. Two-way ANOVA was performed to assess the effects of the chromium supplementation levels, the source of chromium, and the interaction between the level and source (level x source). When the ANOVA indicated significant treatment effects, means were separated using Tukey’s multiple range test. The results are presented in the tables as means with pooled standard errors. The residuals were checked for normality using Shapiro-Wilk test prior to the statistical analysis. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

Results

Compared to the control group, both 3 and 6 mg/kg Cr added to the diet of chickens, irrespective of its form, led to higher intake of Cr ($P < 0.001$). An increase in Cr content in ileum was noted in group receiving 6 mg/kg Cr-Pic and 3 mg/kg Cr-NP relative to control group ($P = 0.025$). Compared to the control group, in liver of chickens receiving 6 mg/kg Cr-Pic and Cr-NP irrespective of its level, higher Cr content was noted ($P = 0.013$). An increase in Cr content in breast muscle was noted in group receiving 6 mg/kg Cr-NP ($P = 0.048$), while an increase in Cr content in skin was determined in group receiving 6 mg/kg Cr-Pic ($P = 0.038$). Compared to the control group, both 3 and 6 mg/kg Cr added to the diet of chickens, irrespective of its form resulted in increased content of this element in feathers ($P < 0.001$). An increase in Cr content in femur was noted in group receiving Cr-Pic irrespective of its level relative to control group ($P = 0.042$) (Table 2).

Table 2. Cr content in selected tissues and feathers.

Treatment ¹	Cr intake	Ileum	Liver	Breast muscle	Femur	Skin	Feathers
	mg/kg BW	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
Control	2.20	0.206	0.454	0.168	0.309	0.224	<LOQ
3 mg/kg Cr-Pic	9.62*	0.247 ^b	0.498	0.176 ^{bc}	0.524 ^{bs}	0.219	0.635 ^{bs}
6 mg/kg Cr-Pic	16.97*	0.389 ^{as}	0.511*	0.184 ^b	0.959 ^{as}	0.286*	1.350 ^{as}
3 mg/kg Cr-NP	10.44*	0.356 ^{abs}	0.579*	0.170 ^c	0.316 ^c	0.229	0.545 ^{cs}
6 mg/kg Cr-NP	16.46*	0.193 ^c	0.590*	0.230 ^{as}	0.315 ^c	0.255	0.589 ^{cs}
SEM	0.362	0.019	0.023	0.014	0.046	0.038	0.052
Level (L)							
3 mg/kg	10.03	0.302	0.538	0.173	0.420	0.224	0.590
6 mg/kg	16.72	0.291	0.551	0.207	0.637	0.271	0.969
Source (S)							
Cr-Pic	13.29	0.281	0.504	0.180	0.714	0.253	0.993
Cr-NP	13.45	0.252	0.585	0.200	0.316	0.242	0.567
<i>P-value</i>							
Control vs. all others	<0.001	0.025	0.013	0.048	0.042	0.038	<0.001
Level (L)	<0.001	0.181	0.026	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Source (S)	0.144	0.009	<0.001	<0.001	<0.001	0.024	<0.001
L x S interaction	0.245	<0.001	0.820	<0.001	<0.001	0.302	<0.001

^{a,b,...} Means within the same column differ significantly ($P \leq 0.05$) according to Tukey mean comparison (only in the case of significant LxS interaction).

SEM = standard error of the mean (SD for all chickens divided by the square root of the number of chickens, $n = 45$).

¹Cr-Pic—chromium picolinate; Cr-NP—chromium nanoparticles

LOQ- limit of quantification

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242820.t002>

Irrespective of source, an increase in Cr content in liver ($P = 0.026$) and skin ($P < 0.001$) were noted in chickens receiving 6 mg Cr/kg compared to chickens receiving 3 mg Cr/kg. The addition of Cr in the form of Cr-Pic increased the accumulation of this element more than the addition of Cr-NP in the skin ($P = 0.024$). On the other hand, chickens from the Cr-NP treatment had higher Cr content in the liver ($P < 0.001$) than chickens from the Cr-Pic treatment (Table 2). Two-way ANOVA showed level \times source interactions for Cr content in the ileum ($P < 0.001$), breast muscle ($P < 0.001$), femur ($P < 0.001$) and feathers ($P < 0.001$). The interaction was due to the fact that the addition of 6 mg/kg of Cr-Pic to diet compared to addition of 3 mg/kg of Cr-Pic increased Cr content in ileum of the chickens, while the corresponding level of Cr-NP decreased it. On the other hand, the addition of 6 mg/kg of Cr-NP to diet compared to addition of 3 mg/kg Cr-NP increased Cr content in the breast muscle, which was not observed for Cr-Pic. The addition of 6 mg/kg of Cr-Pic compared to addition of 3 mg/kg of Cr-Pic resulted in an increase in Cr content in the femur and feathers, while this effect was not observed for Cr-NP (Table 2).

In our study, the ex vivo test showed no effect of deposited Cr in the ileum wall on P absorption. Similarly, the use of Cr in the diet in the form of both Cr-Pic and Cr-NP had no effect on estimated intestinal absorption of P (Table 3).

Compared to the control group, both 3 and 6 mg/kg Cr added to the diet of chickens, irrespective of its form, led to higher P content in ileum and skin ($P = 0.041$ and $P = 0.026$, respectively). An increase in P content in blood plasma and feathers was noted in group receiving 6 mg/kg Cr-Pic and 3 mg/kg and 6 mg/kg Cr-NP relative to control group ($P = 0.038$; $P = 0.037$, respectively). Compared to the control group, in groups 6 mg/kg Cr-Pic and 3 mg/kg and 6 mg/kg Cr-NP, in femur lower P content was noted ($P = 0.012$). An increase in P content in

Table 3. Concentration of P in the serosal bath at 4.5 and 4.8 g P/L in the gut sac.

Treatment ¹	Concentration of P mg/L in serosal bath at 4.5 g P/L in gut sac	% P in serosal bath at 4.5 g P/L in gut sac	Concentration of P mg/L in serosal bath at 4.8 g P/L in gut sac	% P in serosal bath at 4.8 g P/L in gut sac
Control	4.138	91.95	4.159	86.64
3 mg/kg Cr-Pic	4.121	91.57	4.146	86.37
6 mg/kg Cr-Pic	4.140	92.00	4.146	86.38
3 mg/kg Cr-NP	4.140	91.99	4.175	86.97
6 mg/kg Cr-NP	4.152	92.26	4.153	86.51
SEM	0.123	0.118	0.144	0.203
Level (L)				
3 mg/kg	4.130	91.78	4.160	86.67
6 mg/kg	4.146	92.13	4.149	86.44
Source (S)				
Cr-Pic	4.130	91.78	4.146	86.37
Cr-NP	4.146	92.13	4.164	86.74
<i>P-value</i>				
Control vs. all others	0.214	0.354	0.158	0.462
Level (L)	0.326	0.214	0.236	0.415
Source (S)	0.102	0.177	0.132	0.105
L \times S interaction	0.141	0.423	0.126	0.107

^{a,b,...} Means within the same column differ significantly ($P \leq 0.05$) according to Tukey mean comparison (only in the case of significant L \times S interaction).

SEM = standard error of the mean (SD for all chickens divided by the square root of the number of chickens, $n = 45$).

¹Cr-Pic—chromium picolinate; Cr-NP—chromium nanoparticles

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242820.t003>

Table 4. Content of phosphorus in selected tissues and feathers.

Treatment	Blood plasma	Ileum	Breast muscle	Liver	Femur	Skin	Feathers
	mmol/L	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
Control	1.826	1.882	1.092	2.321	80.63	0.324	<LOQ
3 mg/kg Cr-Pic	1.546 ^{c*}	2.020 ^{b*}	0.962	2.766 ^{a*}	81.75	0.442*	<LOQ ^d
6 mg/kg Cr-Pic	2.151 ^{b*}	2.580 ^{a*}	1.084	2.081 ^{c*}	51.51*	0.697*	0.062 ^{c*}
3 mg/kg Cr-NP	2.296 ^{a*}	2.110 ^{b*}	1.134	2.260 ^b	60.63*	0.599*	0.289 ^{a*}
6 mg/kg Cr-NP	2.254 ^{a*}	2.081 ^{b*}	1.186	2.279 ^b	50.33*	0.763*	0.161 ^{b*}
SEM	0.078	0.015	0.023	0.075	0.590	0.055	0.031
Level (L)							
3 mg/kg	1.921	2.065	1.048	2.513	71.17	0.520	0.289
6 mg/kg	2.202	2.330	1.135	2.180	50.90	0.730	0.111
Source (S)							
Cr-Pic	1.848	2.300	1.023	2.423	66.63	0.509	0.062
Cr-NP	2.275	2.096	1.160	2.269	55.47	0.681	0.225
<i>P-value</i>							
Control vs. all others	0.038	0.041	0.132	0.046	0.012	0.026	<0.001
Level (L)	0.009	0.009	0.037	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Source (S)	0.035	0.035	0.009	0.018	<0.001	0.005	<0.001
L x S interaction	0.005	0.005	0.472	<0.001	0.529	0.266	<0.001

^{a,b,c,d} Means within the same column differ significantly ($P \leq 0.05$) according to Tukey mean comparison (only in the case of significant L×S interaction).

SEM = standard error of the mean (SD for all chickens divided by the square root of the number of chickens, $n = 45$).

¹Cr-Pic—chromium picolinate; Cr-NP—chromium nanoparticles

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242820.t004>

liver was noted in group receiving Cr-Pic irrespective of its level ($P = 0.046$), while decrease in P content in blood plasma was determined in group receiving 3 mg/kg Cr-Pic ($P = 0.038$) compared to control group (Table 4).

Irrespective of source, an increase in P content in breast muscle ($P = 0.037$) and skin ($P < 0.001$) and decrease in P content in femur ($P < 0.001$) were noted in chickens receiving 6 mg Cr/kg compared to chickens receiving 3 mg Cr/kg. The addition of Cr to the diet in the form of Cr-NP increased phosphorus levels more than in the form of Cr-Pic in the breast muscle ($P = 0.009$), and skin ($P = 0.005$), while causing a greater decrease in the femur ($P < 0.001$).

The results of two-way ANOVA showed level × source interactions for P content in the blood plasma ($P = 0.005$), ileum ($P = 0.005$), liver ($P < 0.001$) and feathers ($P < 0.001$; Table 4). The analysis showed that the addition 6 mg/kg of Cr-Pic to diet compared to the addition of 3 mg/kg of Cr-Pic increased P content in the blood plasma and ileum, which was not observed for Cr-NP. The addition of 6 mg/kg of Cr-Pic to diet compared to 3 mg/kg Cr-Pic decreased P content in the liver, which was not observed for Cr-NP. On the other hand, the addition of 6 mg/kg of Cr-Pic compared to 3 mg/kg of Cr-Pic increased the content of P in the feathers, while the addition of 6 mg/kg of Cr-NP to diet compared to 3 mg/kg of Cr-NP decreased it (Table 4).

Discussion

Cr is absorbed in the small intestine together with other metal ions [11], but the exact mechanism of this process is not yet fully understood. Cr(III) absorbed in the intestine binds to plasma proteins, which transport it to the liver and other organs. The transport protein is usually transferrin [25]. Our study shows that the addition of Cr to the diet of chickens depending

on the source increased its accumulation in ileum, liver, breast muscle, femur, and especially in the feathers. However, increasing the dose of Cr from 3 to 6 mg/kg increased the accumulation of this element in the selected tissues and feathers. Many researchers have found that Cr accumulates mostly in the liver, kidneys, and spleen, and less in the heart, muscles, bones, and brain [25–27]. Sirarat et al. [7] reported that Cr administered to broilers in the form of Cr-Pic nanoparticles accumulates mainly in the liver of the birds. Some tissues, such as bone, testicular, and epididymal tissues, have been shown to accumulate Cr over a long period of time, whereas accumulation of this element in the heart, pancreas, and brain is relatively short-lived [32]. Cr is probably incorporated into the bone structure in the mineralization process. Due to their similar ionic radius, Cr can probably replace Ca in bones, thereby affecting their structure. According to literature data [20–22], Ca content in chicken bones is about 20%. Therefore, based on our research, it can be assumed that a very small amount of Cr which was deposited in the femur (from about 0.0003% in the control group to about 0.0006% for the 6 mg/kg supplement) can potentially be integrated into the bone structure in place of Ca. According to Bronner [33], the total Cr content in bones is about 2.5 times as high as in all other tissues. Accumulation of Cr in the skeleton does not seem desirable, as it may change the structure of hydroxyapatite and thus increase bone fragility. Our study shows that in addition to the level of Cr used, its form also affects its accumulation in tissues. Chromium applied in the form of Cr-Pic accumulates more in the femur, skin and feathers than Cr in the form of Cr-NP, while in the form of Cr-NP it accumulates more in the liver and breast muscle than in the form of Cr-Pic. In contrast, Sathyabama et al. [34], in research conducted on laying hens, found that Cr accumulation in tissues was not affected by the form used (Cr-Pic or Cr-NP), but only by the level applied. Cr(III) administered orally as either inorganic salt or an organic complex was not acutely toxic to rats, with $LD_{50} > 2000$ mg/kg BW [9]. Rhodes et al. [35] reported a no-observed-adverse-effect level (NOAEL) ≥ 2015 mg/kg BW/day for chromium picolinate monohydrate. Therefore, even in the case of the highest Cr intake by chickens, i.e. about 17 mg/kg BW, neither LD_{50} nor NOAEL was exceeded. Excessive accumulation of Cr in the liver may lead to disturbances in liver metabolism, intensify oxidative reactions and lead to morphological changes in this organ [2, 8].

The available literature provides no data on the mechanism of Cr absorption in enterocytes, whereas the mechanism of P absorption has been described quite thoroughly. Absorption of P in the small intestine can be paracellular, taking place through passive diffusion or active transport involving Na-dependent transport proteins [36]. The most common is transcellular absorption, which involves three phosphate co-transporters: type IIb Na-dependent phosphate co-transporter (NaPi-IIb), inorganic phosphate transporter 1 (PiT-1), and inorganic phosphate transporter 2 (PiT-2). NaPi-IIb in broilers is primarily expressed in the duodenum and is considered the most important P transporter in the small intestine [36]. According to Hu [37] PiT-1 and PiT-2 are expressed in the small intestine of broilers, and also regulate intestinal P absorption.

Our *ex vivo* tests showed that the use of Cr in the diet of chickens in various forms and levels would not affect intestinal absorption of P. The results can probably be explained by the fact that Cr and P have different ion charges and can therefore be absorbed into enterocytes through different channels and may have different affinities to transport proteins.

Nevertheless, Cr absorbed into the body can indirectly affect the P level in plasma and its deposition in other tissues. However, it should be noted that the effect of dietary Cr on P absorption can be dependent on age (young chickens have an immature intestinal epithelium compared to 35 days old birds). P level in blood plasma is dependent on time of slaughtering, and changes over the day with distance from last feeding. Literature data indicate that P content in chicken tissues is about 20 mg/L in plasma [37], from 0.116 g/kg [37] to 1.32 g/kg [7] in

the liver, from 0.108 mg/kg [37] to 1.7 g/kg [38] in muscles, and from 0.292 g/kg [37] to 83 g/kg [16–18, 39] in the bones. Sirirat et al. [7], in a study in chickens receiving supplements of 500 or 3000 ppb Cr in the form of nanoparticles, noted a higher content of P in the liver (by 67% compared to the control). In contrast, Sathyabama et al. [34] reported no effect of dietary Cr supplementation on plasma or liver levels of P in laying hens. Our study showed that as the Cr level in the diet of chickens increased, irrespective of the form used, P levels increased in the ileum, blood plasma, breast muscle, skin, and feathers, but decreased in the liver and femur. According to Sahin et al. [4], Cr levels and forms used in the diet of chickens may have reduced the secretion of corticosterone, a hormone associated with stress. Sahin et al. [4] noted reduced plasma corticosterone levels in chickens exposed to heat stress and at the same time receiving Cr in the diet. Available literature data show that corticosterone reduces absorption of phosphates into the enterocytes and then into the bloodstream [23], but this effect was not noted in our study. Intestinal absorption and accumulation of phosphates in tissues may also be regulated by other hormones, including PTH, insulin, and dopamine, whose secretion is influenced by Cr [23, 40]. Our previous research [5] has shown that the addition of Cr to the diet of chickens in the form of both Cr-Pic and Cr-NP increases insulin secretion, while the addition of Cr in the form of Cr-NP increases plasma dopamine levels.

According to Sankaramanivel et al. [41], phosphorus is unlikely to be released from bones; if the level is reduced in cells, it is more likely that absorption from the intestine will increase or that its elimination in the urine will decrease. Our research, however, indicates that resorption of P from bones was very high (at about 30%) after application of Cr-NP (3 and 6 mg/kg) and Cr-Pic at 6 mg/kg compared to the control, which is an adverse effect of the use Cr in the diet of chickens. This is an innovative result of our research, as it indicates the potential risk of using Cr in the diet of chickens. Recent research has shown that bone mineralization is also affected by oxidative stress [42]. According to Soudani et al. [42], Cr(VI) is a well-known oxidizing agent in several tissues. Intracellular Cr(VI) is converted to more stable Cr(III) with the production of reactive oxygen species (ROS). According to Yang et al. [43] and Sontakke and Tare [44], ROS are involved in the resorption of Ca and P from bone. Our previous research [5] showed that Cr may have a pro-oxidative effect, and therefore the reduction in P levels noted in the bones may also be associated with oxidative stress generated by Cr. Stepniowska et al. [5] noticed that the addition of 6 mg/kg Cr to the diet of chickens, increased lipid peroxidation in both the liver and breast muscle, as evidenced by increased LOOH levels. Also the changes in the activity of antioxidant enzymes noted in this study were the body's response to the intensification of oxidative processes due to the addition of Cr to the diet. Additionally the addition of Cr to the diet of chickens in the form of both Cr-Pic and Cr-NP adversely affects growth performance. Chickens receiving Cr supplements had lower final body weights and higher daily feed intake [2]. Therefore, this research should be continued to enable a detailed assessment of the absorption, digestibility, and deposition of P, Ca and Cr in chicken tissues.

Conclusions

Cr was found to accumulate in the tissues of the ileum, liver, breast muscle, and in feathers of chickens. The amount of Cr deposited in the tissues increases with the addition of Cr to the diet, irrespective of the form used. Chromium in the form of Cr-Pic is accumulated more in bones, skin and feathers, while in the form of Cr-NP it is accumulated more in the liver and breast muscle. Chromium deposited in the ileum of chickens does not affect the ex vivo estimated intestinal absorption of P.

The addition of 6 mg Cr/kg to the chicken's diet more than 3 mg Cr/kg increased the content of P in the ileum, blood plasma, breast muscle, and skin, while adversely decreasing it in

the liver, femur, and feathers. Cr reduced the amount of P in the femur when used in the form of Cr-NP at just 3 mg/kg, and in the form of Cr-Pic at 6 mg/kg.

Author Contributions

Conceptualization: Anna Stępniewska, Katarzyna Ognik, Jan Jankowski.

Data curation: Anna Stępniewska, Krzysztof Tutaj, Aleksandra Drażbo, Krzysztof Kozłowski, Katarzyna Ognik, Jan Jankowski.

Formal analysis: Anna Stępniewska, Krzysztof Tutaj, Aleksandra Drażbo, Katarzyna Ognik.

Funding acquisition: Katarzyna Ognik, Jan Jankowski.

Investigation: Anna Stępniewska, Krzysztof Tutaj, Aleksandra Drażbo, Krzysztof Kozłowski, Katarzyna Ognik, Jan Jankowski.

Methodology: Anna Stępniewska, Katarzyna Ognik.

Resources: Katarzyna Ognik, Jan Jankowski.

Writing – original draft: Anna Stępniewska.

Writing – review & editing: Katarzyna Ognik, Jan Jankowski.

References

1. Khan RU, Naz S, Dhama K, Saminathan M, Tiwari R, Jeon GJ, et al. Modes of action and beneficial application of chromium in poultry nutrition, production and health: a review. *Int J Pharm.* 2014; 10: 357–367. <https://doi.org/10.3923/ijp.2014.357.367>
2. Ognik K, Drażbo A, Stępniewska A, Kozłowski K, Listos P, Jankowski J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in broiler chicken diet on the performance, redox status and tissue histology. *Anim Feed Sci Tech.* 2020; 259: 114326. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114326>
3. 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: 53–64. <https://doi.org/10.1385/BTER:89:1:53> PMID: 12413051
4. Sahin N, Akdemir F, Tuzcu M, Hayirli A, Smith MO, Sahin K. Effects of supplemental chromium sources and levels on performance, lipid peroxidation and proinflammatory markers in heat-stressed quails. *Anim Feed Sci Techn.* 2010; 159: 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.004>
5. Stępniewska A, Drażbo A, Kozłowski K, Ognik K, Jankowski J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in the diet of chickens on levels of selected hormones and tissue antioxidant status. *Animals.* 2020; 10: 45. <https://doi.org/10.3390/ani10010045> PMID: 31878318
6. Uyanik F, Kaya S, Kolsuz AH, Eren M, Sahin N. The effects of chromium supplementation on egg production, egg quality, and serum parameters in laying hens. *Turk J Vet Anim Sci.* 2002; 26: 379–387.
7. Sirirat N, Lu JJ, Hung AT, Chen SY, Lien TF. Effects different levels of nanoparticles chromium picolinate supplementation on growth performance, mineral retention, and immune responses in broiler chickens. *J Agr Sci.* 2012; 4(12): 48–58. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n12p48>
8. Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicol.* 2002; 180(1): 5–22. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00378-5](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00378-5) PMID: 12324196
9. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Chromium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2012.
10. National Research Council (NRC), Nutrient Requirements of Poultry, edn 9th rev. National Academy Press, Washington, D. C., USA, 1994.
11. EFSA. Casalegno C, Schifanella O, Zennaro E, Marroncelli S, Briant R. Collate literature data on toxicity of Chromium (Cr) and Nickel (Ni) in experimental animals and humans; 2015.
12. Vincent J. The Nutritional Biochemistry of Chromium(III) 2nd Edition. Amsterdam, Netherlands. Elsevier; 2019.
13. Cohen MD, Kargacin B, Klein CB, Costa M, Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rev in Toxicol.* 1993; 23: 255–281. <https://doi.org/10.3109/10408449309105012> PMID: 8260068

14. Fan WT, Zhao XN, Cheng J, Liu YH, Liu JZ. Oxidative Stress and Hepatocellular Injury Induced by Oral Administration of Cr³⁺ in Chicken. *J Biochem Mol Toxicol*. 2015; 29: 280–287. <https://doi.org/10.1002/jbt.21697> PMID: 25800437
15. Sahin N, Hayirli A, Orhan C, Tuzcu M, Komorowski JR, Sahin K. Effects of the supplemental chromium form on performance and metabolic profile in laying hens exposed to heat stress. *Poult Sci*. 2018; 97(4): 1298–1305. <https://doi.org/10.3382/ps/pex435> PMID: 29365168
16. Piva A, Meola E, Gatta PP, Biagi G, Castellani G, Mordenti AL, et al. The effect of dietary supplementation with trivalent on production performance of laying hens and the chromium content in the yolk. *Anim Feed Sci Tech*. 2003; 106: 149–163. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00006-3)
17. Amiri Andi M, Shahamat A. Effects of different levels of nano chromium chloride in diet on egg quality and blood chromium content of laying japanese quail. *Int J Adv Biol Biomed Res*. 2015; 3: 378–383. <https://doi.org/10.18869/IJABBR.2015.378>
18. Hung AT, Leury BJ, Sabin MA, Lien TF, Dunshea FR. Dietary chromium picolinate of varying particle size improves carcass characteristics and insulin sensitivity in finishing pigs fed low- and high-fat diets. *Anim Prod Sci*. 2015; 55: 454–460. <https://doi.org/10.1071/AN12255>
19. Li X, Zhang D, Yang TY, Bryden WL. Phosphorus Bioavailability: a key aspect for conserving this critical animal feed resource with reference to broiler nutrition. *Agriculture*. 2016; 6: 25. <https://doi.org/10.3390/agriculture6020025>
20. Kozłowski K, Jankowski J, Jeroch H. Efficacy of different phytase preparations in broiler rations. *Pol J Vet Sci*. 2009; 12: 389–393. PMID: 19886262
21. Kozłowski K, Jankowski J, Jeroch H. Efficacy of *Escherichia coli*-derived phytase on performance, bone mineralization and nutrient digestibility in meat-type turkeys. *Vet ir Zootech (Vet Med Zoot)*. 2010a; 52: 59–66.
22. Kozłowski K, Jankowski J, Jeroch H. Efficacy of different levels of *Escherichia coli* phytase in broiler diets with a reduced P content. *Pol J Vet Sci*. 2010b; 13: 431–436.
23. Levi M, Gratton E, Forster IC, Hernando N, Wagner CA, Biber J, et al. Mechanisms of phosphate transport. *Nature Rev Nephrol*. 2019; 15(8): 482–500. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0159-y> PMID: 31168066
24. McCarty MF. Anabolic effects of insulin on bone suggest a role for chromium picolinate in preservation of bone density. *Med Hypoth*. 1995; 45(3): 241–246. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90112-4](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90112-4)
25. Uyanik F, Eren M, Guclu BK, Sahin N. Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites, and tissue chromium levels of Japanese quails. *Biol Trace Elem Res*. 2005; 103(2): 187–197. <https://doi.org/10.1385/BTER:103:2:187> PMID: 15772442
26. Wang MQ, He YD, Lindemann MD, Jiang ZG. Efficacy of Cr (III) supplementation on growth, carcass composition, blood metabolites, and endocrine parameters in finishing pigs. *Asian-Austr J Anim Sci*. 2009; 22(10): 1414–1419. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.90111>
27. Zha LY, Xu ZR, Wang MQ, Gu LY. Effects of chromium nanoparticles dosage on growth, body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007; 8(5): 323–330. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0323> PMID: 17542060
28. Aviagen Ross 308 Broiler: Management Manual. Aviagen LTD., Midlothian, UK, 2018
29. Ognik K, Stępniewska A, Cholewińska E, Kozłowski K. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in drinking water on estimated intestinal absorption of iron, zinc, and calcium. *Poult Sci*. 2016; 95: 2045–2051. <https://doi.org/10.3382/ps/pew200> PMID: 27307476
30. Dobrzański Z, Opaliński S, Hoffmann K, Bubel F, Pogoda-Sewerniak K. Effect of different feed phosphates on blood plasma mineral profile in laying hens. *Electr J Pol Agric Univer*. 2011; 14(4): 15. <http://www.ejpau.media.pl/volume14/issue4/art-15.html>
31. Murphy J, Riley JR. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal Chim Acta*. 1962; 27: 31–36.
32. Lindemann MD, Cromwell GL, Monegue HJ, Purser KW. Effect of chromium source on tissue concentration of chromium in pigs. *J Anim Sci*. 2008; 86: 2971–2978. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0888> PMID: 18599670
33. Bronner F. Chapter 25 Metals in Bone Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lead, Silicon, and Strontium. Edited by Bilezikian J., Martin T.J., Raisz L. *Principles of Bone Biology* 3rd Edition, Academic Press; 2008
34. Sathyabama T, Jagadeeswaran A. Effect of chromium supplementation on performance, mineral retention and tissue mineral accumulation in layer chickens. *J Anim Res*. 2016; 6(6): 989–994. <https://doi.org/10.5958/2277-940x.2016.00142.x>
35. Rhodes MC, Hébert CD, Herbert RA, Morinello EJ, Roycroft JH, Travlos GS, et al. Absence of toxic effects in F344/N rats and B6C3F1 mice following subchronic administration of chromium picolinate

- monohydrate. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.006> PMID: [15582192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15582192/)
36. Hu Y, Liao X, Wen Q, Lu L, Zhang L, Luo X. Phosphorus absorption and gene expression levels of related transporters in the small intestine of broilers. *Brit J Nutr.* 2018; 119: 1346–1354. <https://doi.org/10.1017/S0007114518000934> PMID: [29845902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29845902/)
 37. Ebeledike EU, Nwokedi GIC, Ndu OO, Okoye FBC, Ochiogu IS. Calcium and phosphorus contents of body parts of some domestic animals used as meat source in Nigeria. *Asian Pac J Trop Med,* 2010; 3 (5): 395–398. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60096-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60096-X)
 38. Cloft SE, Robison CI, Karcher DM. Calcium and phosphorus loss from laying hen bones autoclaved for tissue removal. *Poult Sci.* 2018; 97: 3295–3297. <https://doi.org/10.3382/ps/pey201> PMID: [29800483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29800483/)
 39. Suchy P, Strakova E, Herzig I, Steinhauser L, Kralik G, Zapletal D. Chemical composition of bone tissue in broiler chickens intended for slaughter. *Czech J Anim Sci.* 2009; 54: 324–330.
 40. Xu H, Dai S, Zhang K, Ding X, Bai S, Wang J, et al. Dietary phosphorus deficiency impaired growth, intestinal digestion and absorption function of meat ducks. *Asian-Austr J Anim Sci.* 2019; 32: 1897–1906. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0683>
 41. Sankaramanivel S, Jeyapriya R, Hemalatha D, Djody S, Arunakaran J, Srinivasan N. Effect of chromium on vertebrae, femur and calvaria of adult male rats. *Human Exp Toxicol.* 2006; 25: 311–318. <https://doi.org/10.1191/0960327105ht627oa> PMID: [16866188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16866188/)
 42. Soudani N, Amara IB, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Najiba Zegha N. Oxidative stress induced by chromium (VI) in bone of suckling rats. *Toxicol Industr Health.* 2011; 27(8): 724–734. <https://doi.org/10.1177/0748233710395992> PMID: [21543464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21543464/)
 43. Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, and Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem.* 2001; 276: 5452–5458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001004200> PMID: [11098048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11098048/)
 44. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect bone metabolism. *Clin Chim Acta.* 2002; 3: 145–148. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(01\)00766-5](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00766-5) PMID: [11880125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11880125/)



The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in broiler chicken diet on the performance, redox status and tissue histology

Katarzyna Ognik^{a,*}, Aleksandra Drazbo^b, Anna Stępniewska^a, Krzysztof Kozłowski^b, Piotr Listos^c, Jan Jankowski^b

^a Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Biology, Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

^b Department of Poultry Science, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland

^c Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-033 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Chromium
Nanoparticles
Performance
Redox
Chicken

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether the abdominal fat can be reduced in broiler chickens by supplementing the diet with chromium without interfering with important metabolic functions, histology and without deteriorating performance, carcass yield, and whether it may be useful to use chromium nanoparticles to achieve this aim. The experiment was carried out on 405 day-old male Ross 308 chickens randomly divided into five treatment groups, with nine replicates of nine birds each. The basal diets (control group) were supplemented with two levels of chromium (Cr) (3 and 6 mg/kg) and two different Cr sources (Cr-picolinate and Cr-nano) to obtain four experimental diets: 3.0 mg/kg of Cr-picolinate (3 mg/kg Cr-Pic), 6.0 mg/kg of Cr-picolinate (6 mg/kg Cr-Pic), 3.0 mg/kg of Cr-nano (3 mg/kg Cr-NP) and 6.0 mg/kg of Cr-nano (6 mg/kg Cr-NP). Performance, slaughter analysis, tissue histology, biochemistry and antioxidant and oxidant parameters were examined. The addition of Cr in levels of 3 and 6 mg/kg of diet (irrespective of the form used – Cr-Pic or Cr-NP) reduced abdominal fat, stimulated the antioxidant defence system, increased glucose content, negatively affected growth performance, disturbed liver function, and caused histopathological changes in the pancreas and liver. Therefore, future attempts to establish a beneficial effect of chromium on broiler chickens should use smaller amounts of this element than 3 mg/kg of diet in the case of both organic forms and nanoparticles.

Abbreviations: ALB, albumin; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; BW, body weight; BWG, body weight gain; CAT, catalase; Cr, chromium; CREAT, creatinine; CRP, C-reactive protein; DFI, daily feed intake; FCR, feed conversion ratio; GLU, glucose; GPx, glutathione peroxidase; GTF, glucose tolerance factor; LDH, lactate dehydrogenase; LOOH, lipid peroxides; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; TAS, total antioxidant status; TC, total cholesterol; TP, total protein; UREA, urea

* Corresponding author.

E-mail addresses: kasiaognik@poczta.fm (K. Ognik), aleksandra.drazbo@uwm.edu.pl (A. Drazbo), anna.stepniewska@up.lublin.pl (A. Stępniewska), kristof@uwm.edu.pl (K. Kozłowski), piotr.listos@up.lublin.pl (P. Listos), janj@uwm.edu.pl (J. Jankowski).

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114326>

Received 21 November 2018; Received in revised form 21 October 2019; Accepted 21 October 2019
0377-8401/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years research has been conducted to evaluate the response of animal organisms to chromium (Cr) used as a dietary supplement. Since intake of Cr is usually low in feed and diets therefore attention of researchers is focused for exploring the possible beneficial aspects of Cr supplementation on biological activities, body composition and health of animals (Khan et al., 2014). Chromium is the main component of glucose tolerance factor (GTF). Its ability to regulate the level of glucose by activating insulin secretion enables proper metabolic transformations of carbohydrates, proteins and lipids. In auto-amplification of insulin signaling major role plays chromodulin. This protein binds strongly four chromic binding ion before this oligopeptide acquires a conformation needed for binding to the insulin receptor via the tyrosine kinase active site (Vincent, 2000). Chromium is also thought to be essential for the activation of certain enzymes and for stabilization of proteins and nucleic acids. Chromium deficiency can disrupt the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids (Sahin et al., 2010). Insulin metabolism is known to affect lipid peroxidation (Preuss et al., 1997; Gallaher et al., 1993; Mikulski et al., 2009), and therefore Cr, as a cofactor of insulin, may exhibit antioxidant activity. The available literature contains a few reports on the potential effect of Cr (through induction of the release of cytokines) on the immune response in animals, including chickens (Wang et al., 1996; Granchi et al., 1998; Uyanik et al., 2002b). In heat-stressed Japanese quail inhibition of lipid peroxidation – a decrease in serum malondialdehyde (MDA) – was observed when Cr was added to the diet (Sahin et al., 2002b). Sahin et al. (2002a) found that increased Cr supplementation to chickens under heat stress caused a reduction in corticosterone, an indicator of stress, and an increase in insulin levels in the blood.

Chromium is not currently considered an essential trace element for poultry, but it is thought that this micronutrient may play a nutritional and physiological role. The review of Khan et al. (2014) showed that the addition of Cr to the diet of poultry can improve the metabolism of carbohydrates and lipids, reduce stress reactions, stimulate the immune and antioxidant system, and above all, it can improve weight gain and reduce fatness of the carcass. From the point of view of the producer of poultry meat and the consumer, the reduction of abdominal fat is a desired effect. The research results presented so far, however, are often divergent in terms of the possibility of reducing fat cover due to the use of Cr in poultry nutrition, and at the same time not very comprehensive. The use of Cr additive to the poultry diet at doses of 200–3200 µg/kg resulted in both a reduction in abdominal fat (Lien et al., 1999; Sahin et al., 2002b, 2003; Kheiri and Toghyani, 2009; Zha et al., 2009; Naghieh et al., 2010; Noori et al., 2012; Ebrahimzadeh et al., 2013) as well as the lack of impact (Moeini et al., 2011; Ghanbari et al., 2012; Rajalekshmi et al., 2014).

The National Research Council (National Research Council (NRC, 1994) recommends 300 µg/kg Cr in the diets of laboratory animals, but there are no NRC recommendations for Cr in poultry. According to the EFSA (2009), research conducted on poultry using supplementation with Cr picolinate and yeast enriched with Cr in the amount of 0.8 mg Cr/kg of feed showed no effect on growth performance in chickens and turkeys. According to research carried out on farm animals, Cr introduced into the body in the form of Cr(III) has measurable effects on production, and its availability in the organism depends on the form used (Mirfendereski and Jahanian, 2015; Sirirat et al., 2012; Uyanik et al., 2002b). The availability of organic forms is thought to be 10 times greater than that of inorganic forms (Sirirat et al., 2012). Recently scientists have taken up new challenges involving intensive research to evaluate the potential use of nanochromium as a prophylactic feed additive for animals (Amiri Andi and Shahamat, 2015; Sirirat et al., 2012; Hung et al., 2015). The EFSA has not yet established maximum dosages for various forms of Cr, including nanoparticles. Apart from the beneficial effect of Cr on the body, the potential toxic effects of an inappropriate dose should be taken into account.

The aim of this study was to investigate whether the abdominal fat can be reduced in chickens by supplementing the diet with Cr without interfering with important metabolic functions, histology and without deteriorating performance, carcass yield, and whether it may be useful to use Cr nanoparticles to achieve this aim.

2. Material and methods

2.1. Chromium source

Chromium nanopowder (Cr-nano, purity 999 g/kg, 60 ~ 80 nm, spherical, specific surface area 6–8 m²/g, bulk density 0.15 g/cm³, true density 8.9 g/cm³) was purchased from SkySpring Nanomaterials (USA). Chromium picolinate (purity > 980 g/kg) was purchased from Sigma-Aldrich Sp. z o.o. (Poznan, Poland).

2.2. Animals and diets

The experiment was carried out in a poultry house at the experimental facilities of the Department of Poultry Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland. A total of 405 day-old male Ross 308 chickens were randomly divided into five treatment groups, with nine replicates of nine birds each, and kept in cages. All birds had free access to feed and water. Each cage was equipped with nipple drinkers and a feeder that was manually filled on a daily basis. The heating and light program was in accordance with the Ross Broiler Management Manual (Aviagen, 2018). The experimental procedure was approved by the Local Animal Experimentation Ethics Committee in Olsztyn.

The chemical composition of the basal starter (1–21 days) and grower/finisher (22–35 days) diets is shown in Table 1. The basal diets (control group) were supplemented with two levels of Cr (3 and 6 mg/kg) and two different Cr sources (Cr-picolinate and Cr-nano) to obtain four experimental diets: 3.0 mg/kg of Cr-picolinate (3 mg/kg Cr-Pic), 6.0 mg/kg of Cr-picolinate (6 mg/kg Cr-Pic), 3.0 mg/kg of Cr-nano (3 mg/kg Cr-NP) and 6.0 mg/kg of Cr-nano (6 mg/kg Cr-NP) (Table 2). The experimental additives were added to the feed mixtures in the form of suspensions in rapeseed oil (0.5 g oil to 100 g feed). A control group was fed the same diet but

Table 1
Composition and nutrient density of diets.

	1–21 days of age	22–35 days of age
Components, g/kg		
Maize	200.0	200.0
Soybean meal	336.5	282.4
Wheat	383.4	421.4
Soybean oil	39.0	56.1
Salt	3.3	3.3
Limestone	11.9	11.6
MCP ¹	14.4	13.3
DL-Methionine, 990 g/kg	3.1	2.8
L-Lysine HCl, 780 g/kg	2.7	3.1
L-Threonine, 985 g/kg	0.7	1.0
Vitamins + trace minerals ²	5.0	5.0
Calculated nutrient density, g/kg		
Crude protein	220.0	200.0
Dry matter	878.7	880.4
Ash	59.2	55.3
Lysine	13.0	12.0
Methionine	6.2	5.7
Methionine + Cysteine	10.0	9.2
Threonine	8.5	8.0
Calcium	9.5	9.0
Available phosphorus	4.8	4.5
ME, kcal/kg	2950	3100

¹ MCP, monocalcium phosphate.

² Provided per kilogram of diet: 1–21 days of age: vit. A, 15,000 IU; vit. D₃, 5000 IU; vit. E, 112 IU; vit. K₃, 4 mg; vit. B₁, 3 mg; vit. B₂, 8 mg; vitamin B₆, 5 mg; vit. B₁₂, 16 mg; folic acid, 2 mg; biotin, 0.2 mg; nicotinic acid, 60 mg; calcium pantothenic, 18 mg; choline, 1.8 g; Mn, 100 mg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.15 mg; 22–35 days of age: vit. A, 12,000 IU; vit. D₃, 5000 IU; vit. E, 75 IU; vit. K₃, 2 mg; vit. B₁, 2 mg; vit. B₂, 6 mg; vit. B₆, 4 mg; vit. B₁₂, 16 mg; folic acid, 1.75 mg; biotin, 0.05 mg; nicotinic acid, 60 mg; calcium pantothenic, 18 mg; choline, 1.6 g; Mn, 100 mg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.15 mg.

Table 2
Content of Cr in the diets.

	1–21 days of age	22–35 days of age
Amount of Cr added to feed	Analysed content of Cr, mg/kg	
0	0.86	0.83
3 mg/kg Cr-Pic	3.90	3.36
6 mg/kg Cr-Pic	6.71	6.20
3 mg/kg Cr-NP	3.85	3.87
6 mg/kg Cr-NP	6.49	6.08

without supplemental Cr. The nutritional value of all experimental diets corresponded to the nutrient requirements of broiler chickens (Aviagen, 2018).

2.3. Growth trial and sample collection

During the experiment, body weight (BW), average daily gain (ADG) and feed consumption were recorded and calculated on a pen basis. Average daily feed intake (ADFI) per bird was calculated based on total feed consumption for the pen for the entire experimental period divided by the number of days in the period. The feed conversion ratio (FCR; gain-to-feed ratio) was calculated on a pen basis from body weight gain and feed consumption.

At 35 day of age, nine broilers in one group was selected from each replicate, which means the broilers with the closest weights to the average weight were selected from each replicate, tagged, and fasted for 8 h. Blood samples were taken from the same nine birds from each group (one bird for each replication). Then nine broilers per group (one bird representing the average body weight per pen) were killed at a slaughterhouse. The birds (without being transported) were electrically stunned (400 mA, 350 Hz), hung on a shackle line and exsanguinated by a unilateral neck cut severing the right carotid artery and jugular vein. After a 3-min bleeding period, the birds were scalded at 61 °C for 60 s, defeathered in a rotary drum picker for 25 s, and manually eviscerated. Following evisceration, whole carcasses were stored at 4 °C and hand-deboned on a cone 24 h post mortem. The yields of whole carcass, breast muscles, leg muscles (thigh and drumstick without skin), heart, liver, gizzard, and abdominal fat were determined relative to live body weight (BW). Liver, pancreas, jejunum, and duodenum samples were collected for histological examination.

2.4. Laboratory analysis

Cr content in the samples of feed mixtures was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES 720/730-ES, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

The plasma content of total cholesterol (TC), urea (UREA), total protein (TP), albumin (ALB), glucose (GLU), creatinine (CREAT), and C-reactive protein (CRP), as well as the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and lactate dehydrogenase (LDH), were measured using an automatic biochemical analyser (Plasma Diagnostic Instruments Horiba, Kyoto, Japan).

Markers of oxidative stress determined in the blood included lipid oxidation indicators, i.e. the concentration of lipid hydroperoxides (LOOH) and malondialdehyde (MDA), using kits produced by Cell Biolabs, Inc. (San Diego, USA). Activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in the blood of the broilers was determined by spectrometry using Ransel and Ransod diagnostic kits manufactured by Randox (Poland). A diagnostic kit manufactured by Oxis International, Inc. (Portland, USA) was used to determine catalase activity (CAT). Total antioxidant status (TAS) was determined in the blood using a diagnostic kit by Randox (Poland).

2.5. Histological examinations of the tissue samples

Samples of the liver, pancreas, jejunum and duodenum were cut in two lengthwise and fixed for 24 h in 5% formalin, pH = 7.2. Within 24 h the fixed tissue fragments were passed through increasing concentrations of alcohol solutions, acetone and xylene into paraffin blocks in a tissue processor (Leica TP-20). Paraffin-embedded microscope sections 5 µm thick were stained with hematoxylin and eosin (HE staining). Morphometric evaluation of the tissues was carried out using a computer-assisted microscopic image analysis system. The system includes a light microscope (Nikon Eclipse E600) with a digital camera (Nikon DS-Fi1) and a PC with image-analysis software (NIS-Elements BR-2.20, Laboratory Imaging).

2.6. Statistical analysis

For performance parameters, each replicate pen (n = 9) was considered as an experimental unit for the statistical analysis. For analysis of other parameters, individual birds (n = 9) were considered as experimental units. The data were subjected to two-way ANOVA to examine the following effects: a) main effect of Cr source (Cr-Pic and Cr-NP), b) main effect of Cr inclusion level (0, 3, 6 mg/kg), and c) interaction between Cr source and inclusion level. When a significant of the Cr inclusion level or source or interaction effect was noted (F test), treatment means were separated using the post-hoc Tukey's test.

All calculations were performed using the GLM procedures of the STATISTICA software system ver. 13.1 (StatSoft Inc., 2016). Data variability was expressed as mean values with a pooled standard error of the mean (SEM), and P < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect on performance and carcass characteristics

Compared with the control group (0 mg/kg), the addition of Cr in the level 3 and 6 mg/kg resulted in a decrease in BW (P = 0.002), ADG (P = 0.002), and ADFI (P = 0.001) (Table 3). The addition of Cr to the diet at the level 3 and 6 mg/kg resulted in a decrease in abdominal fat (P = 0.003) and at the level 6 mg/kg (Cr-Pic) resulted in an increase in liver weight (P ≤ 0.05) relative to the control. Irrespective of the form of Cr, Cr supplement in level 6 mg/kg of feed caused a reduction in the weight of the thigh muscles (P = 0.038) compared with group receiving 3 mg/kg. In broiler chickens receiving the Cr-NP supplement at the level 3 mg/

Table 3
Effect of different Cr forms and levels on growth performance of broiler chickens (35 days of age).

Parameters ³	Dietary treatment ^{1,2}					SEM	Significance level		
	0 Control	3 mg/kg Cr-Pic	6 mg/kg Cr-Pic	3 mg/kg Cr-NP	6 mg/kg Cr-NP		Level effect (L)	Source effect (S)	L x S interaction
Initial BW, kg	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.0001	0.903	0.691	0.960
Final BW, kg	2.088 ^a	1.992 ^{ab}	1.971 ^b	1.991 ^{ab}	2.040 ^{ab}	0.013	0.002	0.288	0.362
ADG, g/bird/day	58.56 ^a	55.82 ^{ab}	55.23 ^b	55.78 ^{ab}	57.19 ^{ab}	0.383	0.002	0.288	0.360
ADFI, g/bird/day	86.71 ^a	82.58 ^b	81.93 ^b	81.51 ^b	83.74 ^b	0.628	0.001	0.545	0.655
FCR	1.486	1.521	1.490	1.459	1.472	0.009	0.633	0.135	0.413

^{a-c}Means with different superscripts within the same line differ significantly (P < 0.05), according to Tukey's test.

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP) and 0 - without Cr supplementation.

² Data represent mean values of 9 replicate pens per treatment (9 chickens per pen).

³ BW, body weight, ADG, average daily gain, ADFI, average daily feed intake, FCR, feed conversion ratio.

Table 4

Effect of different Cr forms and levels on slaughter analysis of broiler chickens (35 days of age) and relative weights of selective organs and carcass cuts.

Parameters	Dietary treatment ^{1,2}					SEM	Significance level		
	0 Control	3 mg/kg Cr-Pic	6 mg/kg Cr-Pic	3 mg/kg Cr-NP	Cr-NP		Level effect (L)	Source effect (S)	L x S interaction
Body weight (BW) before slaughter, g	2.098	1.994	1.996	2.053	2.089	0.023	0.294	0.214	0.636
Carcass yield, g/100 g BW	72.99	74.18	72.48	73.10	73.53	0.379	0.676	0.987	0.444
Breast muscles, g/100 g BW	21.64	22.05	22.00	22.74	22.56	0.224	0.273	0.313	0.766
Thigh muscles, g/100 g BW	9.17 ^a	9.24 ^a	8.74 ^b	9.46 ^a	8.00 ^b	0.198	0.038	0.591	0.449
Drumstick muscles, g/100 g BW	6.38	6.46	6.25	6.37	5.97	0.068	0.116	0.335	0.673
Abdominal fat, g/100 g BW	0.489 ^a	0.379 ^{bc}	0.382 ^{bc}	0.448 ^b	0.207 ^c	0.026	0.003	0.423	0.076
Gizzard, g/100 g BW	1.024	1.096	1.072	1.008	1.057	0.022	0.728	0.422	0.667
Liver, g/100 g BW	1.989 ^b	1.897 ^b	2.333 ^a	1.915 ^b	2.061 ^{ab}	0.041	0.002	0.188	0.125
Heart, g/100 g BW	0.464 ^{ab}	0.484 ^a	0.484 ^a	0.421 ^b	0.467 ^{ab}	0.008	0.353	0.044	0.127

^{a-c}Means with different superscripts within the same line differ significantly ($P < 0.05$), according to Tukey's test.

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP) and 0 - without Cr supplementation.

² Data represent mean values of 9 replicate pens per treatment (1 chicken per pen).

kg, lower heart weights were recorded ($P \leq 0.05$) than in the chickens receiving Cr-Pic (Table 4).

3.2. Effect on biochemistry and redox parameters

Compared with the control group, the addition of Cr in the amount of 3 and 6 mg/kg both as Cr-Pic and Cr-NP caused an increase in the plasma content of glucose ($P = 0.007$) in the broiler chickens. The addition of Cr to broiler chicken feed in the amount of 3 and 6 mg/kg caused a decrease in ALT and LDH activity ($P < 0.001$, both) relative to the control group. In the plasma of broiler chickens receiving the Cr-Pic supplement, ALT and LDH activity were higher ($P < 0.001$, both) than in broiler chickens receiving Cr-NP.

The addition of Cr to the broiler chicken diet regardless of level caused an increase in AST and ALP activity ($P < 0.001$, both) relative to the control group. In the plasma of broiler chickens receiving the Cr-Pic supplement, ALP activity were lower ($P < 0.001$, respectively) than in broiler chickens receiving Cr-NP. Compared with the control group, the addition of Cr-Pic in the amount of 6 mg/kg and Cr-NP in the amount of 3 and 6 mg/kg caused a decrease in the plasma activity of AST ($P \leq 0.05$). Two-way ANOVA showed level x source interactions for AST and ALP activity ($P < 0.001$, both) in the plasma. The significant level x source interactions were due to the fact that the activity of these enzymes was influenced by both the level of the supplement and its source, but their effect on the same indicator was often different. Analysis showed that increasing the Cr-Pic Cr supplement from 3 to 6 mg/kg of feed resulted in an increase in AST and ALP activity, while a corresponding increase in Cr in the form of Cr-NP did not increase the activity of these enzymes. Compared to the control group, the addition of Cr at the level 6 mg/kg to the broiler chicken feed

Table 5

Effect of different Cr forms and levels on biochemical parameters of broiler chicken blood.

Parameters ³	Dietary treatment ^{1,2}					SEM	Significance level		
	0 Control	3 mg/kg Cr-Pic	6 mg/kg Cr-Pic	3 mg/kg Cr-NP	6 mg/kg Cr-NP		Level effect (L)	Source effect (S)	L x S interaction
GLU, mmol/L	9.555 ^b	10.895 ^a	10.778 ^a	10.593 ^a	10.939 ^a	0.215	0.007	0.894	0.864
TC, mmol/L	3.166	3.474	3.134	3.206	3.076	0.057	0.142	0.276	0.511
TP, g/L	45.767	45.564	45.128	45.911	45.112	0.511	0.811	0.905	0.984
ALB, g/L	30.801	30.763	30.235	30.529	30.921	0.388	0.972	0.848	0.884
UREA, mmol/L	2.361	2.475	2.452	2.542	2.415	0.073	0.701	0.943	0.955
CREAT, μmol/L	26.00 ^a	23.66 ^{ab}	21.00 ^b	23.61 ^{ab}	21.77 ^b	0.436	< 0.001	0.712	0.842
ALT, U/L	17.546 ^a	9.782 ^c	11.737 ^b	7.287 ^d	10.598 ^{bc}	0.544	< 0.001	< 0.001	0.059
AST, U/L	245.92 ^b	271.84 ^b	325.97 ^a	334.41 ^a	306.68 ^a	5.973	< 0.001	0.027	< 0.001
ALP, U/L	1227.0 ^d	2850.7 ^c	5399.3 ^b	6439.6 ^a	6677.4 ^a	322.26	< 0.001	< 0.001	< 0.001
LDH, U/L	1247.2 ^a	653.3 ^c	958.4 ^b	464.3 ^d	647.7 ^c	42.39	< 0.001	< 0.001	0.075
CRP, mg/dL	1.235	1.259	1.142	1.202	1.183	0.016	0.069	0.851	0.358

^{a-c}Means with different superscripts within the same line differ significantly ($P < 0.05$), according to Tukey's test.

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP) and 0 - without Cr supplementation.

² Data represent mean values of 9 replicate pens per treatment (1 chicken per pen).

³ GLU, glucose, TC, total cholesterol, TP, total protein, ALB, albumin, CREAT, creatinine, ALT, alanine aminotransferase, AST, aspartate aminotransferase, ALP, alkaline phosphatase, LDH, lactate dehydrogenase, CRP, C-reactive protein.

Table 6
Effect of different Cr forms and levels on redox indicators of broiler chicken blood.

Parameters ³	Dietary treatment ^{1,2}					SEM	Significance level		
	0 Control	3 mg/kg Cr-Pic	6 mg/kg Cr-Pic	3 mg/kg Cr-NP	6 mg/kg Cr-NP		Level effect (L)	Source effect (S)	L x S interaction
LOOH, $\mu\text{mol/L}$	6.511 ^a	5.112 ^b	5.294 ^b	4.560 ^c	4.119 ^c	0.131	< 0.001	< 0.001	< 0.001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1.960 ^a	1.928 ^a	1.824 ^{ab}	1.720 ^b	1.681 ^b	0.025	< 0.001	0.003	0.067
SOD, U/g Hb	2606.8 ^a	2523.6 ^b	2387.7 ^c	2094.4 ^e	2279.7 ^d	28.37	< 0.001	< 0.001	< 0.001
GPx, U/g Hb	86.05 ^a	84.01 ^a	76.38 ^b	77.09 ^b	73.46 ^c	0.764	< 0.001	< 0.001	0.077
CAT, U/g Hb	6153.1 ^a	5823.1 ^b	4710.6 ^d	5660.6 ^c	4622.4 ^d	93.50	< 0.001	< 0.001	0.118
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1.069 ^c	1.116 ^b	1.027 ^d	1.169 ^a	1.110 ^b	0.008	< 0.001	< 0.001	0.066

^{a-e}Means with different superscripts within the same line differ significantly ($P < 0.05$), according to Tukey's test.

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP) and 0 - without Cr supplementation.

² Data represent mean values of 9 replicate pens per treatment (1 chicken per pen).

³ LOOH, lipid peroxides, MDA, malondialdehyde, SOD, superoxide dismutase, GPx, glutathione peroxidase, CAT, catalase, TAS, total antioxidant status.

reduced the plasma content of CREAT ($P \leq 0.05$) (Table 5).

The addition of Cr to the chicken feed regardless of level reduced the plasma content of LOOH and MDA ($P < 0.001$, both) and activity of all antioxidant enzymes (SOD, GPx, CAT) ($P < 0.001$, both) relative to the control group. The addition of Cr in the form of Cr-Pic, irrespective of the level, increased the plasma content of MDA ($P = 0.003$), LOOH ($P < 0.001$), and activity of SOD, GPx and CAT ($P < 0.001$) compared to Cr-NP (Table 6).

In the case of plasma content of LOOH, there was a level x source interaction ($P < 0.001$) resulting from the fact that increasing the addition of Cr from 3 to 6 mg/kg decreased the LOOH content in the case of the Cr-NP form, while a corresponding increase in Cr in the form of Cr-Pic did not increase the content of these parameters.

In the case of SOD activity in the blood, a level x source interaction ($P < 0.001$) resulted from the fact that increasing the addition of Cr from 3 to 6 mg/kg caused a decrease in SOD activity when the Cr-Pic form was used, but increased it in the case of Cr-NP.

Irrespective of the form of Cr, the addition of Cr on the level 3 mg/kg of feed caused an increase in TAS content ($P < 0.001$). The addition of Cr in the form of Cr-NP was found to increase the plasma TAS content ($P < 0.001$) more than Cr in the form of Cr-Pic.

3.3. Histology

The histological examination of the duodenum of the chickens from all experimental groups showed that the mucous membrane and villi were properly formed, with no visible pathological changes. The histological image of the jejunum of the broiler chickens from the control group revealed damage to the villi, but no visible pathological changes were observed in the mucous membrane. In the jejunum of broiler chickens receiving 3 or 6 mg/kg Cr-Pic, no visible pathological changes were observed in the mucous membrane, but there was greater (in the group receiving 3 mg/kg Cr-Pic) and substantial (in the group receiving 6 mg/kg Cr-Pic) damage to the villi, combined with their fragmentation. Similarly, in the groups receiving 3 or 6 mg/kg Cr-NP, no visible pathological changes were observed in the mucous membrane, but both groups showed a significant degree of damage to the villi, combined with their fragmentation. The histological examination of the pancreas of the broiler chickens from all experimental groups showed severe hyperaemia, combined with isolated foci of fatty degeneration and extensive fat necrosis. The histological examination of the livers from the control group revealed isolated foci of fatty degeneration, with no visible pathological changes. The addition of 3 mg/kg Cr-Pic to the diet of the broiler chickens caused local hyperaemia of the liver tissue and isolated foci of fatty degeneration. The addition of 6 mg/kg caused more extensive tissue hyperaemia, combined with isolated foci of mononuclear cell infiltration and isolated foci of fatty degeneration. In the groups receiving 3 or 6 mg/kg Cr-NP, a significant degree of tissue hyperaemia with numerous mononuclear cell infiltrates and extensive foci of fatty degeneration was observed (Fig. 1).

4. Discussion

The results of numerous studies indicate that Cr in the form of Cr-Pic can promote growth in chickens when added to the diet in amounts from 200 to 4000 $\mu\text{g/kg}$ (Sahin et al., 2002b, 2003; Toghyani et al., 2006; Naela et al., 2008; Hajjalizadeh et al., 2017). However, research conducted by Suksombat and Kanchanatawee (2005); Anandhi et al. (2006); Ghanbari et al. (2012), and Akbari and Toriki (2014) indicates that the addition of 200–2000 $\mu\text{g/kg}$ Cr-Pic to the diet of chickens does not improve growth performance. Similarly, in the case of CrCl_3 , there are reports indicating that adding this form of Cr to the diet in quantities of 4–20 mg/kg improves growth performance (Eren and Baspinar, 2004; Naela et al., 2008), while amounts of 0.2–80 mg/kg do not affect performance (Uyanik et al., 2002a; Suksombat and Kanchanatawee, 2005). The limited available literature data indicate that the addition of Cr in the form of nanoparticles in quantities of 200–3000 $\mu\text{g/kg}$ has no effect on growth performance (Sirirat et al., 2012; Berenjian et al., 2018). However, according to Zha et al. (2009) and Hajjalizadeh et al. (2017), the addition of Cr nanoparticles in amounts of

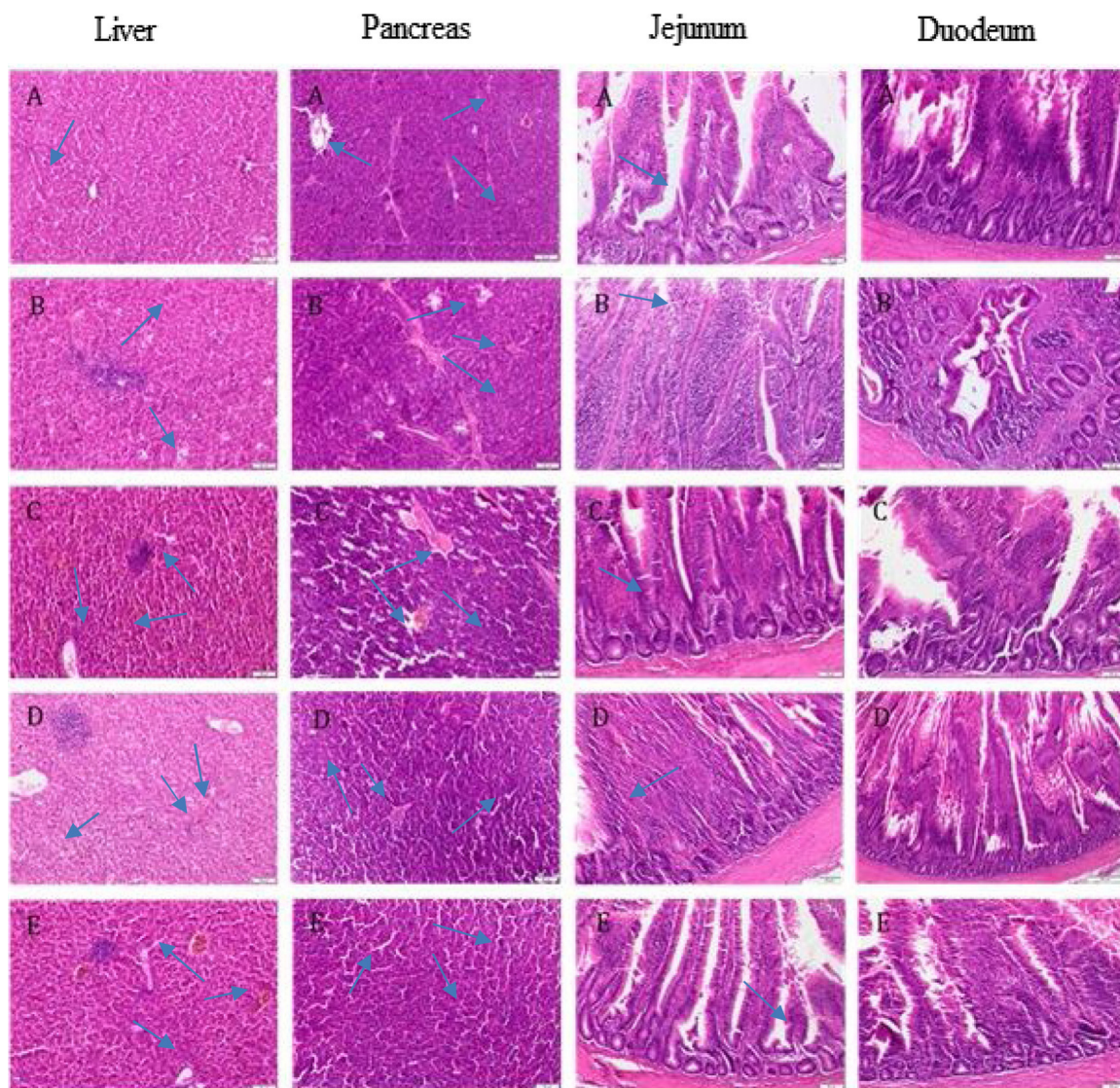


Fig. 1. Morphological effects of different Cr sources on broiler chicken tissues (magnification 10x). Treatments: A – control group, B- 3 mg/kg Cr-Pic, C- 6 mg/kg Cr-Pic, D-3 mg/kg Cr-NP, E- 6 mg/kg Cr-NP.

500–1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ improves growth performance. However, our study has shown that the addition of Cr irrespective of source at 3 and 6 mg/kg level has a negative effect on the growth performance of broiler chickens. The available literature also indicates that the addition of Cr-Pic in the amount of 120 mg/kg and of CrCl_3 in the amount of 200 mg/kg negatively affects the growth performance of chickens (Raut et al., 2012). The conflicting results obtained from studies conducted on poultry may be due to the use of different forms and quantities of Cr, as well as to differences in the means and time of supplementation, the species and age of the birds, and above all induction of stress (Frag et al., 2017).

Our study found an increase in liver weight as a result of supplementation of the broiler chicken diet with Cr at 6 mg/kg. Many authors have also reported increased liver weight during Cr supplementation, even at 200–3200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Lien et al., 1999; Sahin et al., 2002b, 2003). In contrast, Berenjian et al. (2018), who administered Nano-Cr to Japanese quail at 200–1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ under heat stress conditions, noted a decrease in liver weight. In our research, 6 mg/kg of Cr (irrespectively of source) added to the diet of chickens caused a reduction in abdominal fat. Similar results have been obtained by Lien et al. (1999); Sahin et al. (2002b, 2003); Toghyani et al. (2012), and Ebrahimzadeh et al. (2013) following administration of organic forms of Cr to chickens at lower doses of 200–3200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The present study showed that increasing the Cr supplement from 3 to 6 mg/kg results in a decrease in thigh muscle weight. However, many authors have found that Cr in similar doses of 300–3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ had no effect on thigh and muscle drumstick weight (Kroliczewska et al., 2005; Al-Mashhadani et al., 2010; Ghanbari et al., 2012; Sirirat et al., 2012).

In our study, the decreased body weight (including lower thigh muscle weight and reduced fat) in the broiler chickens fed a diet with Cr is explained by the fact that Cr is an active component of glucose tolerance factor (GFT), a complex of molecules that consists

of glycine, cysteine, glutamic acid, nicotinic acid and Cr. This complex synergistically enhances the action of insulin by increasing the binding of this hormone to cells, regulating receptor function, and improving affinity. Some reports suggest that Cr may suppress appetite and stimulate thermogenesis by sensitizing insulin-sensitive glucoreceptors in the brain. The breakdown of fat tissue is associated with insulin sensitivity; peripheral fat is more sensitive to the action of this hormone than the central fat found in the chest and abdominal cavity (Yazaki et al., 2010).

Glucose metabolism in birds differs significantly from that of mammals. Blood glucose levels are much higher in birds, while insulin levels are lower. Birds are also considered less sensitive to insulin than mammals. Chromium is known to increase insulin sensitivity in mammals, and Cr supplementation causes a reduction in the plasma glucose concentration (Brooks et al., 2016). In our study, the addition of Cr to the chicken diet at level 3 and 6 mg/kg irrespectively of form increased GLU content in the blood of chickens. Research carried out by other authors has shown that Cr in the form of Cr-Pic administered in a range of 200–3200 µg/kg reduces the GLU level in the blood (Lien et al., 1999; Sahin et al., 2002b, 2003; Abdallah et al., 2013; Patil et al., 2008). A similar reduction in GLU content in the blood has been observed by Raut et al. (2012) following the addition of Cr-Pic to the diet of chickens in much larger amounts (40–120 mg/kg). Akbari and Torki (2014), who added 1 mg/kg Cr-Pic to the diet of chickens, noted a decrease in GLU in the blood, while Samanta et al. (2008), using a Cr-Pic additive in the amounts of 0.5 and 1 mg/kg, observed no effect on GLU content. A decrease in GLU content in the blood of chickens has also been observed in the case of administration of an inorganic form of Cr (CrCl₃) at 0.5 mg/kg (Mohammed et al., 2014) and in much higher doses of 20–80 mg/kg (Uyanik et al., 2002a). Habibian et al. (2013) observed no effect of Cr on the GLU level following supplementation of chicken diets with CrCl₃ at doses of 600 and 1200 µg/kg. Other authors, using a Cr-yeast additive in the diet of chickens, have reported varied effects on GLU content, often dose-dependent. At low doses of 300–500 µg/kg an increase in GLU in the blood was observed (Krolczewska et al., 2004), while at higher doses of 0.5–2 mg/kg, GLU was shown to decrease (Mohammed et al., 2014; Ibrahim et al., 2010). The results of our research and findings by other authors indicate highly varied effects of the addition of Cr (even when the same forms and doses were used) on the level of GLU in the blood of broiler chickens.

In our study the addition of Cr in the amount of 3 or 6 mg/kg, in the form of both Cr-Pic and Cr-NP, decreased the plasma activity of ALT and LDH, but increased that of AST and ALP. Similarly, Abdallah et al. (2013), using a much smaller addition of Cr-Pic (200–800 µg/kg) to the diet of chickens, reported a decrease in ALT activity. Mohammed et al. (2014), on the other hand, using other forms of Cr (CrCl₃ and Cr-yeast) in the amount of 500 µg/kg, observed no effect of these additives on plasma activity of ALT and AST in chickens. Ibrahim et al. (2010) administered Cr to chickens in the form of Cr-yeast at 0.5–2 mg/kg and noted no effect on the plasma activity of ALT and AST. Research by other authors has shown increased plasma activity of AST in chickens receiving small doses of 0.2–0.4 µg/kg CrCl₃ (Bakhiet and Elbadwi, 2007) as well as much higher doses of 20–200 mg/kg (Eren and Baspinar, 2004; Raut et al., 2012). A similar tendency has been observed for ALP activity. Bakhiet and Elbadwi (2007), who administered Cr to chickens in the form of CrCl₃ in small doses (0.2–0.4 µg/kg), and Uyanik et al. (2002b), using larger doses (20–80 mg/kg), noted increased plasma activity of ALP. Damage to the cells of certain organs, such as the liver, leads to the release of tissue enzymes into the bloodstream. A significant increase in the activity of transaminases (AST and ALT) may be due to enzyme leakage through damaged cell membranes and/or increased enzyme synthesis by the liver. Although the activity of both aminotransferases is usually increased during liver damage due to metal poisoning, a study by Vutukuru et al. (2007) showed that Cr may have different effects on AST and ALT activity. The administration of Cr to carp *Labeo rohita* increased ALT activity, but did not affect AST activity.

The results of our study showed that supplementation of the broiler chicken diet with Cr, in the form of both Cr-Pic and Cr-NP, caused a decrease in the plasma content of CREAT, and increasing the level of these additives reduced it more. Ibrahim et al. (2010), adding Cr-yeast to the diet of chickens at 0.5–2 mg/kg, reported no effect on the plasma content of CREAT, whereas Raut et al. (2012), who added Cr to the diet of chickens in much higher doses (80–200 mg/kg), noted an increase in CREAT content. The decrease in the CREAT level observed in our study indicates that both Cr-Pic and Cr-NP added to the diet of broiler chickens in amounts of 3 and 6 mg/kg have no detrimental effect on kidney function.

Our research has shown that supplementation of the diet of broiler chickens with Cr in the form of both Cr-Pic and Cr-NP at level 3 and 6 mg/kg resulted in a reduction in lipid peroxidation indicators (LOOH and MDA). However, it should be emphasized that Cr in the form of Cr-NP was more effective in reducing the content of these indicators in the plasma of the broiler chickens. Similarly, Rao et al. (2012) added amino acid chelate of elemental trivalent Cr to the diet of chickens in small doses of 100–400 µg/kg and found a lower level of lipid peroxidation and increased GPx activity. Sahin et al. (2002b), who added Cr-Pic to the diet of layers at 400 µg/kg, also noted a reduction in the lipid peroxidation product MDA. Other authors (Fan et al., 2015; Cheng et al., 2016) have reported an increase in the content of MDA, with a simultaneous decrease in the activity of antioxidant enzymes, explaining the results as the effect of oxidative stress. In our study, supplementation of the broiler chicken diet with Cr in the form of Cr-Pic and Cr-NP, at both 3 and 6 mg/kg of diet, reduced the activity of antioxidant enzymes. In addition, the antioxidant capacity of the broiler chicken plasma was increased, especially in the groups receiving Cr at level 3 mg/kg. A reduction in antioxidant enzyme activity has been noted by Fan et al. (2015) in the plasma of chickens receiving CrCl₃ for 42 days at doses from 626 to 2506 mg/kg body weight (12.5–50% LD₅₀). According to Travacio et al. (2001), exposure to Cr may decrease the activity of antioxidant enzymes. Cr (III) may bind to antioxidant enzymes, including CAT and SOD, thus reducing their activity (Cheng et al., 2016). In the context of the decrease observed in the activity of antioxidant enzymes, in the absence of increased content of lipid peroxidation products, it is difficult to state conclusively that the sources and levels of Cr used in our research induced oxidative stress.

Our results showed that supplementation of broiler chicken diets with Cr-NP caused a significant degree of hyperaemia of the hepatic and pancreatic tissue, as well as extensive foci of fatty degeneration in these organs. Research carried out by Fan et al. (2015) and Liu et al. (2015) has demonstrated that excessive consumption of Cr(III) in chickens leads directly to oxidative damage and histopathological changes in organs. Cheng et al. (2016) observed histological changes in the brain of chickens receiving CrCl₃ for 42

days at doses of 626–2506 mg/kg body weight (12.5–50% LD₅₀), characterized by cytoplasmic vacuolization. The reactive oxygen species generated can attack cell membranes and increase their permeability, leading to vacuolization (Hassan et al., 2014).

5. Conclusion

The addition of Cr in both doses of 3 and 6 mg/kg of diet (irrespective of the form used – chromium picolinate or chromium nanoparticles) reduced abdominal fat, stimulated the antioxidant defense system, increased glucose content. However, it affected negatively growth performance and liver function, and caused histopathological changes in the pancreas and liver. Therefore, future attempts to establish a beneficial effect of chromium on chickens should use smaller amounts of this element than 3 mg/kg of diet in the case of both organic forms and nanoparticles.

Declaration of Competing Interest

We declare that all the listed authors meet and agree on the following criteria:

1. This study is original and has not been published elsewhere.
2. All data involved in the manuscript are checked and reliable.
3. All the authors have read and accepted the manuscript as it is submitted for publication.
4. All the authors approve the version to be published.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Science and Higher Education: University of Warmia and Mazury (no. 11.610.004-300) and University of Life Sciences in Lublin (no. ZKT/DS-3).




References

- Aviagen, 2018. Ross 308 Broiler: Management Manual. Aviagen LTD., Midlothian, UK.
- Abdallah, E.A., Abdel Samad, M.H., Abdel Latif, A.M., 2013. Effect of supplementation diet with chromium picolinate on productive, reproductive, physiological performance and immune response of Golden Montazah chickens. *Egypt. Poult. Sci. J.* 33, 751–767.
- Akbari, M., Torki, M., 2014. Effects of dietary chromium picolinate and peppermint essential oil on growth performance and blood biochemical parameters of broiler chicks reared under heat stress conditions. *Int. J. Biometeorol.* 58, 1383–1391.
- Al-Mashhadani, E.H., Ibrahim, D.K., Al-Bandr, L.K., 2010. Effect of supplementing different levels of chromium yeast to diet on broiler chickens performance. *Int. J. Poult. Sci.* 9, 376–381.
- Amiri Andi, M., Shahamat, A., 2015. Effects of different levels of nano chromium chloride in diet on egg quality and blood chromium content of layingjapanese quail. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 3, 378–383.
- Anandhi, M., Mathivanan, R., Viswanathan, K., Mohan, B., 2006. Dietary inclusion of organic chromium on production and carcass characteristics of broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 5, 880–884.
- Bakhiet, A.O., Elbadwi, S.M.A., 2007. Effects of dietary chromium supplementation on the performance and some serum parameters in bovans-type chicks. *J. Pharm. Toxicol.* 2, 402–406.
- Berenjian, A., Sharifi, S.D., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Ghazanfari, S., 2018. Effect of chromium nanoparticles on physiological stress induced by exogenous dexamethasone in japanese quails. *Biol. Trace Elem. Res.* 184, 474–481.
- Brooks, M.A., Grimes, J.L., Lloyd, K.E., Krafka, K., Lamptey, A., Spears, J.W., 2016. Chromium propionate in broilers: effect on insulin sensitivity. *Poult. Sci.* 95, 1096–1104.
- Cheng, J., Fan, W., Zhao, X., Liu, Y., Cheng, Z., Liu, Y., Liu, J., 2016. Oxidative stress and histological alterations of chicken brain induced by oral administration of chromium(III). *Biol. Trace Elem. Res.* 173, 185–193.
- Ebrahimzadeh, S.K., Farhoomand, P., Noori, K., 2013. Effects of chromium methionine supplementation on performance, carcass traits, and the Ca and P metabolism of broiler chickens under heat-stress conditions. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 382–387.
- Eren, M., Baspinar, N., 2004. Effects of dietary CrCl₃ supplementation on some serum biochemical markers in broilers. Influence of season, age and sex. *Revue Méd. Vét.* 155, 637–641.
- Fan, W.T., Zhao, X.N., Cheng, J., Liu, Y.H., Liu, J.Z., 2015. Oxidative stress and hepatocellular injury induced by oral administration of Cr³⁺ in chicken. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 29, 280–287.
- Farag, M.R., Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., Arif, M., Ayasan, T., Dhama, K., Patra, A., Karthik, K., 2017. Role of chromium in poultry nutrition and health: beneficial applications and toxic effects. *Int. J. Pharm.* 13, 907–915.
- Gallaher, D.D., Csallany, A.S., Shoeman, D.W., Olson, J.M., 1993. Diabetes increases excretion of urinary malondehyde cojugates in rats. *Lipids* 28, 663–666.
- Ghanbari, S., Ebrahimpzadeh, Y., Eshratkhan, B., Nazeradi, K., 2012. Effect of dietary chromium supplementation on performance and carcass traits of broiler chicks. *Pak. J. Nutr.* 11, 467–472.
- Granchi, D., Verri, E., Ciapetti, G., Savarino, L., Cenni, E., Gori, A., Pizzoferrato, A., 1998. Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells. *Biomaterials* 19, 283–291.
- Habibian, M., Ghazi, S., Moeini, M.M., 2013. Lack of effect of dietary chromium supplementation on growth performance and serum insulin, glucose, and lipoprotein levels in broilers reared under heat stress condition. *Biol. Trace Elem. Res.* 153, 205–211.
- Hajjalizadeh, F., Ghahri, H., Talebi, A., 2017. Effects of supplemental chromium picolinate and chromium nanoparticles on performance and antibody titers of infectious bronchitis and avian influenza of broiler chickens under heat stress condition. *Vet. Res. Forum* 8, 259–264.
- Hassan, H.A., El-Kholy, W.M., Nour, S.E., 2014. Proanthocyanidin as a cytogenetic protective agent against adverse effects of plant growth regulators supplementation in rats. *Cytotechnology* 66, 585–596.
- Hung, A.T., Leury, B.J., Sabin, M.A., Lien, T.F., Dunshea, F.R., 2015. Dietary chromium picolinate of varying particle size improves carcass characteristics and insulin sensitivity in finishing pigs fed low- and high-fat diets. *Anim. Prod. Sci.* 55, 454–460.
- Ibrahim, D.K., Al-Mashhadani, E.H., Al-Bandr, L.K., 2010. Effect of supplementing different levels of chromium yeast to diet on broiler chickens on some physiological traits. *Pak. J. Nutr.* 9, 942–949.
- Khan, R.U., Naz, S., Dhama, K., Saminathan, M., Tiwari, R., Jeon, G.J., Laudadio, V., Tufarelli, V., 2014. Modes of action and beneficial application of chromium in poultry nutrition, production and health: a review. *Int. J. Pharm.* 10, 357–367.
- Kheiri, F., Toghyani, M., 2009. Effect of different levels of inorganic chromium on performance and immunity of broiler chicks. *J. Anim. Vet. Adv.* 8, 1819–1823.

- Kroliczewska, B., Zawadzki, W., Dobrzanski, Z., Kaczmarek-Oliwa, A., 2004. Changes in selected serum parameters of broiler chicken fed supplemental chromium. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 88, 393–400.
- Kroliczewska, B., Zawadzki, W., Skiba, T., Mieta, D., 2005. Effects of chromium supplementation on chicken broiler growth and carcass characteristics. *Acta Vet. Brno.* 74, 543–549.
- Lien, T.F., Horng, Y.M., Yang, K.H., 1999. Performance, serum characteristics, carcass traits and lipid metabolism of broilers as affected by supplement of chromium picolinate. *Brit. Poult. Sci.* 40, 357–363.
- Liu, Y., Liu, C., Cheng, J., Fan, W., Zhang, X., Liu, J., 2015. Growth performance and oxidative damage in kidney induced by oral administration of Cr(III) in chicken. *Chemosphere* 139, 365–371.
- Mikulski, D., Jankowski, J., Zduńczyk, Z., Wróblewska, M., Sartowska, K., Majewska, T., 2009. The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism, and meat quality of turkeys. *J. Anim. Feed Sci.* 18, 518–530.
- Mirfendereski, E., Jahanian, R., 2015. Effects of dietary organic chromium and vitamin C supplementation on performance, immune responses, blood metabolites, and stress status of laying hens subjected to high stocking density. *Poult. Sci.* 94, 281–288.
- Moeini, M.M., Bahrami, A., Ghazi, S., Targhibi, M.R., 2011. 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.* 144, 715–724.
- Mohammed, H.H., El-Sayed, B.M., Abd El-Razik, W.M., Ali, M.A., Abd El-Aziz, R.M., 2014. The influence of chromium sources on growth performance, economic efficiency, some maintenance behavior, blood metabolites and carcass traits in broiler chickens. *Glob. Vet.* 12, 599–605.
- Naela, M.R., Hoda, A.A., Mohamed, F.F., Sabry, A.A., 2008. Effect of dietary chromium source with or without probiotic on productive performance and immune status of broiler chicken. *Vet. Med. J. Giza.* 56, 7–19.
- Naghieh, A., Toghyani, M., Gheisari, A.A., Saeed, S.E., Miranzadeh, H., 2010. Effect of different sources of supplemental chromium on performance and immune response of broiler chicks. *J. Anim. Vet. Adv.* 9, 354–358.
- National Research Council (NRC), 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*, edn 9th rev. National Academy Press, Washington, D. C., USA.
- Noori, K., Farhoomand, P., Ebrahimpzadeh, S.K., 2012. Effects of the chromium methionine supplementation on performance, serum metabolites and carcass traits in broiler chickens. *J. Anim. Sci. Adv.* 2, 230–235.
- Patil, A., Palod, J., Singh, V.S., Kumar, A., 2008. Effect of graded levels of chromium supplementation on certain serum biochemical parameters in broilers. *Ind. J. Anim. Sci.* 78, 1149–1152.
- Preuss, H.G., Grojec, P.L., Lieberman, S., Anderson, R.A., 1997. Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Nephrol.* 47, 325–330.
- Rajalekshmi, M., Sugumar, C., Chirakkal, H., Ramarao, S.V., 2014. Influence of chromium propionate on the carcass characteristics and immune response of commercial broiler birds under normal rearing conditions. *Poult. Sci.* 93, 574–580.
- Rao, V.R., Raju, M.V.L.N., Panda, A.K., Poonam, N.S., Krishna Murthy, O., Shyam Sunder, G., 2012. Effect of dietary supplementation of organic chromium on performance, carcass traits, oxidative parameters, and immune responses in commercial broiler chickens. *Biol. Trace Elem. Res.* 147, 135–141.
- Raut, S.S., Ganorkar, A.G., Bhandarkar, A.G., Jangir, B.L., Mahaprabhu, R., Kurkure, N.V., 2012. Effect of trivalent chromium on haemato-biochemical and histopathological parameters at higher doses in broilers. *Ind. J. Vet. Pathol.* 36, 73–79.
- Sahin, K., Sahin, N., Kucuk, O., 2002a. Effects of dietary chromium and ascorbic acid supplementation on digestion of nutrients, serum antioxidant status, and mineral concentrations in laying hens reared at a low ambient temperature. *Biol. Trace Elem. Res.* 87, 113–124.
- Sahin, K., Sahin, N., Kucuk, O., 2003. Effects of chromium, and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high ambient temperature (32°C). *Nutr. Res.* 23, 225–238.
- Sahin, K., Sahin, N., Onderci, M., Gursu, F., Cikim, G., 2002b. 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.* 89, 53–64.
- Sahin, N., Akdemir, F., Tuzcu, M., Hayirli, A., Smith, M.O., Sahin, K., 2010. Effects of supplemental chromium sources and levels on performance, lipid peroxidation and proinflammatory markers in heat-stressed quails. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159, 143–149.
- Samanta, S., Haldar, S., Bahadur, V., Ghosh, T.K., 2008. Chromium picolinate can ameliorate the negative effects of heat stress and enhance performance, carcass and meat traits in broiler chickens by reducing the circulatory cortisol level. *J. Sci. Food Agric.* 88, 787–796.
- Sirirat, N., Lu, J., Hung, A.T., Chen, S., Lien, T., 2012. Effects different levels of nanoparticles chromium picolinate supplementation on growth performance, mineral retention, and immune responses in broiler chickens. *J. Agric. Sci.* 4, 48–58.
- StatSoft Inc, 2016. *Statistica (Data Analysis Software System) Version 13.1*. www.statsoft.com.
- Suksombat, W., Kanchanatawee, S., 2005. Effects of various sources and levels of chromium on performance of broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18, 1628–1633.
- Toghyani, M., Shivazad, M., Gheisari, A.A., Zarkesh, S.H., 2006. Performance, carcass traits and hematological parameters of heat-stressed broiler chicks in response to dietary levels of chromium picolinate. *Int. J. Poult. Sci.* 5, 65–69.
- Toghyani, M., Toghyani, M., Shivazad, M., Gheisari, A., Bahadoran, R., 2012. Chromium supplementation can alleviate the negative effects of heat stress on growth performance, carcass traits, and meat lipid oxidation of broiler chicks without any adverse impacts on blood constituents. *Biol. Trace Elem. Res.* 146, 171–180.
- Travacio, M., Polo, J.M., Llesuy, S., 2001. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 162, 137–146.
- Uyanik, F., Atasever, A., Ozdamar, S., Aydin, F., 2002a. Effects of dietary chromium chloride supplementation on performance, some serum parameters, and Immune response in broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* 90, 99–115.
- Uyanik, F., Kaya, S., Kolsuz, A.H., Eren, M., Sahin, N., 2002b. The effects of chromium supplementation on egg production, egg quality, and serum parameters in laying hens. *Taurk. J. Vet. Anim. Sci.* 26, 379–387.
- Vincent, J., 2000. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes. *Nutr. Rev.* 58 (67), 72.
- Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M., Yerramilli, A., 2007. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 4, 224–227.
- Wang, J.Y., Wicklund, B.H., Gustilo, R.B., Tsukayama, D.T., 1996. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials* 17, 2233–2240.
- Yazaki, Y., Faridi, Z., Ma, Y., Ali, A., Northrup, V., Njike, V.Y., Liberti, L., Katz, D.L., 2010. A pilot study of chromium picolinate for weight loss. *J. Altern. Complement. Med.* 16, 291–299.
- Zha, L.Y., Zeng, J.W., Chu, X.W., Mao, L.M., Luo, H.J., 2009. Efficacy of trivalent chromium on growth performance, carcass characteristics and tissue chromium in heat-stressed broiler chicks. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1782–1786.

Article

The Effect of Chromium Nanoparticles and Chromium Picolinate in the Diet of Chickens on Levels of Selected Hormones and Tissue Antioxidant Status

Anna Stępniewska ^{1,*} , Aleksandra Drazbo ², Krzysztof Kozłowski ², Katarzyna Ognik ¹  and Jan Jankowski ² 

¹ Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; kasiaognik@poczta.fm

² Department of Poultry Science, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland; aleksandra.drazbo@uwm.edu.pl (A.D.); kristof@uwm.edu.pl (K.K.); janj@uwm.edu.pl (J.J.)

* Correspondence: anna.stepniowska@up.lublin.pl; Tel.: +48-8144-56916

Received: 13 November 2019; Accepted: 20 December 2019; Published: 24 December 2019



Simple Summary: We have postulated that supplementation with Cr can increase serotonin levels and improve the antioxidant status of chickens, with no adverse effect on the secretion of other hormones. Obtaining such results may be beneficial in high-density rearing of poultry exposed to many stressors. The studies compared the effects of two forms of Cr (Cr-Pic and Cr-NP) found at two doses 3 and 6 mg/kg. It was found that at the dose of 3 mg/kg, the expected beneficial results can be obtained (increase in serotonin and decrease in norepinephrine level), however, due to the deterioration of the antioxidative system, these studies should be continued to verify these results. Due to the adverse effect of Cr at 3 mg/kg on the antioxidant status of chickens, this level of Cr should not be considered in both forms Cr-Pic and Cr-NP as a feed additive for broiler chickens. In the future, studies on the potential beneficial effects of Cr on the organism should take into account doses lower than 3 mg/kg.

Abstract: We have postulated that supplementation with Cr can increase serotonin levels and improve the antioxidant status of chickens, with no adverse effect on the secretion of other hormones. The study aimed to determine what form and dose of Cr more favorably affect the level of selected hormones (insulin, glucagon, serotonin, dopamine, noradrenaline, histamine, T3 and T4) and the antioxidant status (level of malondialdehyde and lipid peroxides, activity of superoxide dismutase and catalase) of chicken tissues. The experiment was carried out on chickens randomly divided into five treatment groups. The basal diets (control group) were supplemented with two levels of Cr (3 and 6 mg/kg) and two Cr sources: Cr-picolinate (Cr-Pic) and Cr-nano (Cr-NP) to obtain four experimental diets: 3 mg/kg Cr-Pic, 6.0 mg/kg Cr-Pic, 3.0 mg/kg Cr-NP and 6.0 mg/kg Cr-NP. The addition of Cr in both forms increased the level of serotonin at a dose of 3 mg/kg and, at the same time, reduced the level of noradrenaline. The addition of Cr at 3 mg/kg, irrespective of the form used, regulated the level of hormones of carbohydrate metabolism (increasing insulin levels and reducing glucagon levels) and had an adverse effect on the antioxidant status of the liver and breast muscle. Due to the adverse effect of Cr at 3 mg/kg on the antioxidant status of chickens, this level of Cr should not be considered in both forms Cr-Pic and Cr-NP as a feed additive for broiler chickens. In the future, studies on the potential beneficial effects of Cr on the organism should take into account doses lower than 3 mg/kg.

Keywords: chromium; nanoparticles; hormones; chicken; antioxidant; supplementation

1. Introduction

Studies conducted on laboratory animals [1,2] and a few on farm animals [3,4] show that chromium (Cr) may affect the secretion of certain hormones, mainly insulin, glucagon, and serotonin. Chromium in the form of picolinate (Cr-Pic) has been shown to reduce blood glucose in laboratory animals and in diabetes patients by increasing insulin secretion [5,6]; alleviate symptoms of depression [7], and reduce cortisol levels in laboratory animals [8]. Research in rats [8] has shown that Cr increases the peripheral availability of tryptophan, an amino acid essential for serotonin synthesis in the brain (5-HT). Sahin et al. [9] reported reduced corticosterone levels in broiler chickens kept under heat stress conditions and, at the same time, receiving a Cr-Pic supplement. Both increased serotonin levels and reduced corticosterone levels suggest that Cr may have a stress-relieving effect. According to Sahin et al. [9], chromium may also increase secretion of thyroid hormones triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) in heat-stressed chickens. Thyroid hormones are considered to be growth stimulants in poultry [9–12]. According to Sahin et al. [9], the addition of Cr to the diet of chickens increases the levels of hormones T3 and T4 and, at the same time, improves the growth performance of broiler chickens kept under stress. There have been many studies [9,13] suggesting that Cr can be used during heat stress, but they do not explain the mechanism whereby Cr alleviates stress responses and improves the growth of chickens under stress. In addition, there is some concern that the wrong forms and doses of Cr may interfere with the functions of other hormones, such as histamine, insulin, or glucagon. Chromium (III) is a component of glucose tolerance factor (GTF), which takes part in glucose metabolism by enhancing the effect of insulin. Cr improves the effectiveness of insulin by increasing its binding to receptors and thereby increasing the sensitivity of target cells [14,15].

Cr is believed to be necessary for the activation of certain enzymes and for the stabilization of proteins and nucleic acids, and for this reason, it is considered to display antioxidant activity [16]. A study by Tezuka et al. [17] found that Cr protects rats against oxidative damage associated with carbon tetrachloride, while Preuss et al. [18] noted reduced lipid peroxidation in isolated hepatocytes of rats receiving supplementation with chromium picolinate and nicotinate. In hypertensive rats receiving Cr as picolinate, TBARS in the liver and kidneys decreased as well [18]. The mechanism of the antioxidant effect of Cr is still not fully understood and requires further research.

Increasingly, the sale of poultry feed additives includes preparations containing various forms and doses of Cr. Literature data suggest that Cr can have both positive and negative effects, and no safe dose and form have been established so far. Cr-based feed additives currently available for sale are recommended as stress-relieving supplements, e.g., heat or transport stress. We believe that our research will deepen our knowledge and allow us to determine whether preparations with Cr can be used in the range of 3–6 mg/kg as follows from the literature data or, for example, you cannot exceed the level of 3 mg/kg as shown in our previous studies [19]. A detailed assessment of the impact of Cr on hormonal balance and tissue redox status has not been presented in the literature so far and can certainly help determine whether Cr is safe for the organism and whether it should be used in poultry at all. We have postulated that supplementation with Cr can increase serotonin levels and improve the antioxidant status of chickens, with no adverse effect on the secretion of other hormones, including neurotransmitters. The study aimed to determine what form (Cr-Pic or Cr-nano (Cr-NP)) and dose of Cr (3 or 6 mg/kg) more favorably affect the level of selected hormones (insulin, glucagon, serotonin, dopamine, noradrenaline, histamine, T3 and T4) and the antioxidant status of chicken tissues.

2. Material and Methods

2.1. Nanomaterial

Chromium nanopowder (Cr-NP) with purity 99.9%, size 60~80 nm, spherical shape, specific surface area 6–8 m²/g, bulk density 0.15 g/cm³, and true density 8.9 g/cm³ was purchased from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA).

2.2. Animals and Diets

The experiment was carried out in a poultry house at the experimental facilities of the Department of Poultry Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland. Day-old male Ross 308 chickens (405 male birds) were randomly divided into 5 treatment groups, with nine replicates of 9 birds each. The control group received a basal diet without any additives. Group 3 mg/kg Cr-Pic received 3.0 mg/kg of Cr-picolinate, group 6 mg/kg Cr-Pic—6.0 mg/kg of Cr-picolinate, while group 3 mg/kg Cr-NP—3.0 mg/kg of Cr-nano and group 6 mg/kg Cr-NP—6.0 mg/kg of Cr-nano. The experimental additives were added to the feed mixtures in the form of suspensions in rapeseed oil (0.5%). The nutritional value of all experimental diets corresponded to the nutrient requirements of broiler chickens (Aviagen, 2014). Birds were kept in cages, and each cage was equipped with nipple drinkers and a feeder that was manually filled daily. All chickens had free access to feed and water. The heating and light program was in accordance with the Ross Broiler Management Manual (Aviagen, 2014). The experimental procedure was approved by the Local Animal Experimentation Ethics Committee in Olsztyn (Mo. 30/2015).

The chemical composition of the basal starter (0–21 days) and grower/finisher (22–35 days) diets is shown in Table 1.

2.3. Growth Trial and Sample Collection

During the experiment, body weight gain (BWG) and feed consumption were recorded and calculated on a pen basis. Daily feed intake (ADFI) per bird was calculated based on total feed consumption for the pen for the entire experimental period divided by the number of days in the period. The feed conversion ratio (FCR; kg of feed/kg of body weight gain) was calculated on a pen basis from body weight gain and feed consumption [19].

At 35 days of age, 9 birds representing the average body weight of each group were selected, tagged, and fasted for 8 h. Blood samples were taken from 9 birds from each group (one bird for each replication). Then 9 broilers per group (one bird representing the average body weight per pen) were killed at a slaughterhouse. The birds (without being transported) were electrically stunned (400 mA, 350 Hz), hung on a shackle line, and exsanguinated by a unilateral neck cut severing the right carotid artery and jugular vein. After a 3-min bleeding period, the birds were scalded at 61°C for 60 s, defeathered in a rotary drum picker for 25 s, and manually eviscerated. The breast muscles and liver were collected for further analysis.

Table 1. Composition and nutrient density of the diets.

	Days 1–21	Days 22–35
Components, g/kg		
Maize	200.0	200.0
Soybean meal	336.5	282.4
Wheat	383.4	421.4
Soybean oil	39.0	56.1
Salt	3.3	3.3
Limestone	11.9	11.6
MCP	14.4	13.3
DL-Methionine	3.1	2.8
L-Lysine HCL	2.7	3.1
L-Threonine	0.7	1.0
Vitamins + trace minerals ¹	5.0	5.0
Calculated nutrient density, g/kg		
Crude protein	220.0	200.0
Lysine	13.0	12.0
Methionine	6.2	5.7
Met. + Cys.	10.0	9.2
Threonine	8.5	8.0
Calcium	9.5	9.0
Available phosphorus	4.8	4.5
ME, kcal/kg	2950	3100
Amount of Cr added to feed		Analyzed content of Cr, mg/kg
0		0.86
3 mg/kg Cr-Pic		3.90
6 mg/kg Cr-Pic		6.71
3 mg/kg Cr-NP		3.85
6 mg/kg Cr-NP		6.49

¹ Provided per kilogram of diet: days 1 to 21: vit. A, 15,000 IU; vit. D₃, 5000 IU; vit. E, 112 IU; vit. K₃, 4 mg; vit. B₁, 3 mg; vit. B₂, 8 mg; vitamin B₆, 5 mg; vit. B₁₂, 16 mg; folic acid, 2 mg; biotin, 0.2 mg; nicotinic acid, 60 mg; calcium pantothenicum, 18 mg; choline, 1.8 g; Mn, 100 mg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.15 mg; days 22 to 35: vit. A, 12,000 IU; vit. D₃, 5000 IU; vit. E, 75 IU; vit. K₃, 2 mg; vit. B₁, 2 mg; vit. B₂, 6 mg; vit. B₆, 4 mg; vit. B₁₂, 16 mg; folic acid, 1.75 mg; biotin, 0.05 mg; nicotinic acid, 60 mg; calcium pantothenicum, 18 mg; choline, 1.6 g; Mn, 100 mg; Zn, 80 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.15 mg. ME – metabolic energy.

2.4. Laboratory Analysis

Mineral (Ca, Mg, Fe, Cu, and Zn) content in the blood samples and Cr content in feed, liver, and breast muscle samples was determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Kits produced by Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA) were used to determine the level of the following hormones: insulin, glucagon, serotonin, dopamine, noradrenaline, histamine, T3 and T4.

In the liver and breast muscle of the chickens, the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the concentration of lipid peroxides (LOOH) and malondialdehyde (MDA) were determined. The adrenaline assay by Greenwald [20], for determination of superoxide dismutase, was modified at 320 nm to increase the selectivity of transient reaction products at this wavelength [21], whereas catalase was assayed according to the method of Bartosz [21]. Lipid peroxides were determined according to the method of Buege and Aust [22] and malondialdehyde according to the method of Salih et al. [23].

2.5. Statistical Analysis

For performance parameters, each replicate pen ($n = 9$) was considered as an experimental unit for the statistical analysis. For analysis of other parameters, individual birds ($n = 9$) were considered as experimental units. The Statistica software package version 13.1 (Statsoft Inc., Kraków, Poland, 2016)

was used to determine whether variables differed between treatment groups. The comparison of the control group vs. all other groups was performed by planned contrast analysis. Two-way ANOVA was performed to assess the effects of the supplementation levels of chromium, the source of chromium, and the interaction between the level and source of chromium (dose x source). When the ANOVA indicated significant treatment effects, means were separated using Tukey's multiple range test. The results are presented in the tables as mean values with pooled standard errors. Data were checked for normal distribution before the statistical analysis was performed. Differences were considered to be significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

In the whole rearing period, the control group consumed 2.246 mg Cr/kg BW. In the liver of birds, 0.454 $\mu\text{g Cr/g}$ was noted, whereas in the breast muscle, 0.168 $\mu\text{g Cr/g}$. In the groups receiving Cr at 3 mg/kg, hepatic accumulation of Cr was 18.5% more than in the control group and 2.9% more in the breast muscle than in the control group. In groups receiving Cr at a dose of 6 mg/kg in the liver accumulated by 21.4% more Cr, and in the breast muscle by 3.9% more Cr than in the control group. According to the USEPA, the maximum permissible limit of Cr in chicken meat is 1 mg/kg and has not been exceeded [24].

Compared to the control group, the addition of Cr to the chicken diet in the amount of both 3 and 6 mg/kg, irrespective of the form, resulted in a lower final body weight (2.08 vs. 1.99 vs. 2.00 kg, $p = 0.033$), lower ADFI (86.7 vs. 82.5 vs. 82.8 g/bird/day, $P = 0.046$), and lower livability (98.77 vs. 98.77 vs. 97.53 %, $p = 0.042$). The Cr source was found to have no effect on growth performance [19].

An increase in insulin content was noted in the group receiving 6 mg/kg Cr-NP relative to the control group ($p < 0.001$). Compared to the control group, the addition of Cr at 3 and 6 mg/kg, irrespective of the form used, increased the content of serotonin ($p < 0.001$), while reducing the content of noradrenaline ($p = 0.001$). Two-way ANOVA showed dose x source interactions for serotonin and insulin levels, because increasing Cr-NP from 3 to 6 mg/kg of feed resulted in an increase in serotonin and insulin while increasing Cr-Pic did not. A decrease in glucagon ($p = 0.016$) and histamine ($p < 0.001$) content was noted in the groups receiving Cr-Pic at 3 and 6 mg/kg and Cr-NP at 3 mg/kg relative to the control group. Compared to the control group, the addition of Cr-NP irrespectively of the dose used, increased the content of dopamine ($p < 0.001$), while the addition of Cr-Pic at dose 6 mg/kg increased the content of T4 ($p = 0.029$). The addition of Cr in the form of Cr-NP increased the content of dopamine more than in the form of Cr-Pic ($p < 0.001$) (Table 2).

Compared to the control group, the addition of 3 and 6 mg/kg Cr to the diet of chickens, irrespectively of form used, caused an increase in the plasma content of Ca and Fe ($p < 0.001$, both), while reducing the content of Mg ($p = 0.001$) and Zn ($p < 0.001$). A decrease in Cu content ($p < 0.001$) was noted in the group receiving 6 mg/kg Cr-Pic and 3 and 6 mg/kg Cr-NP relative to the control group. Increasing the Cr dose to chickens' diet from 3 to 6 mg/kg contributed to an increase in Fe content ($p < 0.001$) and a decrease in Cu content ($p < 0.001$) in blood plasma. The addition of Cr as Cr-NP was found to increase the plasma content of Fe ($p < 0.001$) and to reduce the content of Cu and Zn ($p < 0.001$, both) more than Cr-Pic (Table 3).

Table 2. Content of hormones in the blood plasma of chickens.

Treatment ^{1,2}	Insulin ng/mL	Glucagon pg/mL	Serotonin ng/mL	Dopamine pg/mL	Noradrenaline ng/mL	Histamine ng/mL	T3 ng/mL	T4 ng/mL
Control	0.487	51.682	118.503	479.449	2.586	18.892	3.391	48.463
3 mg/kg Cr-Pic	0.568 ^b	45.797 *	142.982 ^{*c}	479.682	2.233 *	14.967 *	3.676	52.562
6 mg/kg Cr-Pic	0.576 ^b	45.303 *	147.089 ^{*c}	450.686	2.207 *	16.937 *	3.769	53.952 *
3 mg/kg Cr-NP	0.581 ^b	45.465 *	166.645 ^{*b}	538.004 *	2.180 *	11.517 *	3.332	53.260
6 mg/kg Cr-NP	0.945 ^{*a}	48.037	212.522 ^{*a}	537.471 *	2.195 *	19.842	3.461	53.596
SEM	0.033	0.723	5.067	7.019	0.039	0.517	0.078	0.844
Dose effect (D)								
3 mg/kg	0.575	45.631	154.813	508.843	2.207	13.242	3.504	52.911
6 mg/kg	0.761	46.670	179.806	494.078	2.201	18.389	3.615	53.774
Source effect (S)								
Cr-Pic	0.572	45.550	145.036	465.184	2.220	15.952	3.722	53.257
Cr-NP	0.763	46.751	189.583	537.737	2.187	15.679	3.397	53.428
<i>p</i> -value								
Control vs. all others	<0.001	0.016	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.341	0.029
D effect	<0.001	0.421	<0.001	0.157	0.935	<0.001	0.534	0.637
S effect	<0.001	0.354	<0.001	<0.001	0.658	0.570	0.076	0.925
D × S interaction	0.001	0.238	<0.001	0.172	0.778	0.101	0.920	0.773

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP) and 0, without Cr supplementation. ² Data represent mean values of nine replicate pens per treatment (1 chicken per pen). * Means within the same column differ significantly from the control at $p \leq 0.05$. ^{a-c} Means within the same column differ significantly ($p \leq 0.05$) according to Newman-Keuls mean comparison (only in the case of significant D × S interaction).

Table 3. Content of minerals in the blood plasma of chickens.

Treatment ^{1,2}	Ca mmol/L	Mg mmol/L	Fe μmol/L	Cu μmol/L	Zn μmol/L
Control	1.662	0.827	6.140	6.252	24.136
3 mg/kg Cr-Pic	2.604 *	0.637 *	9.024 *	6.155	20.428 *
6 mg/kg Cr-Pic	2.676 *	0.589 *	10.445 *	4.803 *	20.752 *
3 mg/kg Cr-NP	2.852 *	0.680 *	10.588 *	5.351 *	19.359 *
6 mg/kg Cr-NP	2.298 *	0.653 *	11.668 *	4.388 *	19.930 *
SEM	0.092	0.020	0.307	0.129	0.281
Dose effect (D)					
3 mg/kg	2.728	0.658	9.806	5.753	19.894
6 mg/kg	2.487	0.621	11.057	4.595	20.342
Source effect (S)					
Cr-Pic	2.640	0.613	9.735	5.479	20.591
Cr-NP	2.575	0.667	11.128	4.869	19.645
<i>p</i> -value					
Control vs. all others	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
D effect	0.136	0.283	<0.001	<0.001	0.061
S effect	0.683	0.125	<0.001	<0.001	<0.001
D × S interaction	0.055	0.757	0.462	0.248	0.596

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP). ² Data represent mean values of nine replicate pens per treatment (1 chicken per pen). * Means within the same column differ significantly from the control at $p \leq 0.05$.

Compared to the control group, the addition of Cr-Pic at 3 mg/kg caused a decrease in LOOH content ($p = 0.023$) in chickens' livers, while the addition of 6 mg/kg Cr-Pic and 3 and 6 mg/kg Cr-NP caused an increase in LOOH content ($p = 0.008$) in breast muscle. An increase in MDA content was noted in groups receiving 6 mg/kg Cr-Pic (in liver) and 3 and 6 mg/kg Cr-NP (in liver and breast muscle) ($p = 0.004$, $p = 0.043$, respectively) relative to control group. Irrespective of the form of Cr used, increasing the addition of this element from 3 to 6 mg/kg of feed caused an increase in LOOH content

($p = 0.031$) and in MDA content ($p = 0.012$) in the liver. Indicators of lipid peroxidation were higher in the liver and breast muscle of chickens from the Cr-NP treatments, i.e. LOOH ($p = 0.002$ and $p = 0.006$) and MDA ($p = 0.003$ and $p = 0.033$). Compared to the control group, the addition of Cr-Pic at 3 and 6 mg/kg caused a decrease in SOD activity ($p < 0.001$) in the liver, while at 3 mg/kg Cr-Pic it caused increased activity of this enzyme in breast muscle ($p = 0.003$). Lower CAT activity ($p < 0.001$) in chickens' livers was noted in groups receiving 3 and 6 mg/kg Cr-NP and 3 mg/kg Cr-Pic, while higher activity in the group receiving 6 mg/kg Cr-Pic compared to the control group. Compared to the control group, the addition of Cr-Pic at 3 mg/kg caused a decrease in CAT activity ($p = 0.038$) in breast muscle, while at 6 mg/kg, it caused an increase in activity of this enzyme. In the liver of chickens receiving Cr at 3 mg/kg, SOD activity ($p = 0.042$) was higher than in the liver of chickens receiving Cr at 6 mg/kg. Increasing the addition of Cr from 3 to 6 mg/kg of feed caused an increase in CAT activity in liver and breast muscle ($p < 0.001$, both). In the liver of chickens from the Cr-NP treatment, higher SOD activity and lower CAT activity were observed than in the chickens from the Cr-Pic treatment ($p < 0.001$, both). In the breast muscle of chickens from the Cr-NP treatment, SOD activity was lower ($p = 0.042$), while CAT activity was higher ($p = 0.023$) (Table 4).

Table 4. Content of redox indicators in the liver and breast muscle of the chickens receiving different sources of Cr.

Treatment ^{1,2}	LOOH, Mmol/Kg		MDA, Mmol/Kg		SOD, U/G Protein		CAT, U/G Protein	
	Liver	Breast Muscle	Liver	Breast Muscle	Liver	Breast Muscle	Liver	Breast Muscle
Control	6.243	2.194	0.805	0.906	1037.8	285.0	708.2	154.8
3 mg/kg Cr-Pic	4.859 *	2.062	0.781	0.825	920.6 *	308.7 *	621.6 *	136.5 *
6 mg/kg Cr-Pic	6.614	2.345 *	1.147 *	0.963	871.6 *	256.6	954.4 *	185.5 *
3 mg/kg Cr-NP	6.153	2.337 *	1.256 *	1.121 *	1009.2	234.9	543.2 *	158.7
6 mg/kg Cr-NP	6.467	2.365 *	1.330 *	1.177 *	976.6	246.8	663.6 *	199.7 *
SEM	0.035	0.016	0.017	0.009	0.307	0.235	0.121	0.082
Dose effect (D)								
3 mg/kg	5.506	2.199	1.018	0.973	964.9	271.8	582.4	147.6
6 mg/kg	6.540	2.355	1.238	1.070	924.1	251.7	809.0	192.6
Source effect (S)								
Cr-Pic	5.736	2.203	0.964	0.894	896.1	282.6	788.0	161.0
Cr-NP	6.310	2.351	1.293	1.149	992.9	240.8	603.4	179.2
<i>p</i> -value								
Control vs. all	0.023	0.008	0.004	0.043	<0.001	0.003	<0.001	0.038
D effect	0.031	0.092	0.012	0.083	0.042	0.103	<0.001	<0.001
S effect	0.002	0.006	0.003	0.033	<0.001	0.042	<0.001	0.023
D × S interaction	0.233	0.342	0.865	0.435	0.338	0.132	0.114	0.226

¹ Diet supplemented with 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium picolinate (3 mg/kg Cr-Pic, 6 mg/kg Cr-Pic) or 6 and 3 mg/kg Cr in the form of chromium nanoparticles (3 mg/kg Cr-NP, 6 mg/kg Cr-NP). ² Data represent mean values of nine replicate pens per treatment (1 chicken per pen) * Means within the same column differ significantly from the control at $p \leq 0.05$. LOOH—lipid peroxides, MDA—malondialdehyde, SOD—superoxide dismutase, CAT—catalase.

4. Discussions

Our earlier research found that Cr supplementations both as Cr-Pic and Cr_NP resulted in lower BW, ADFI, and livability, and reduced antioxidant enzyme activity. Our previous research suggested that the lowest dose of Cr, 3 mg/kg, was toxic for broiler chickens [19]. However, many authors have found a beneficial effect of using various forms of Cr in chickens' diets on production results even when using higher doses of Cr than 3 mg/kg [25,26]. The authors of many studies report that the addition of Cr to the diet of poultry at dose 200–1200 µg/kg increases the activity of cellular insulin [8,27–29]. In our study, the addition of Cr to the diet of chickens, irrespective of its form, resulted in an increase in insulin levels and a decrease in glucagon levels in the blood plasma. Moreover, increasing the dose was found to increase these changes in hormone levels. The changes in the level of both hormones were probably

a response to the increased blood glucose observed in chickens receiving Cr as a diet supplement. The results of our research on blood glucose content in chickens have been published in a paper by Ognik et al. [19]. According to Yildiz et al. [30], Cr is a cofactor for insulin activity. This element is part of the oligopeptide chromodulin, which, by binding to the active site of the insulin receptor tyrosine kinase, plays a role in the auto-amplification of signaling of this hormone. Insulin regulates carbohydrate, fat, and protein metabolism, stimulating amino acid uptake and protein synthesis, as well as glucose utilization in tissues [4].

The increased plasma serotonin levels noted in our study in chickens receiving Cr in the diet, in the form of both Cr-Pic and Cr-NP, were likely the result of increased insulin levels. Insulin supports transport of the serotonin precursor tryptophan across the blood–brain barrier, owing to its ability to increase the uptake of branched chain amino acids (BCAAs) by muscles. Chromium, in the form of picolinate, indirectly affects this process by reducing branched chain amino acids in the blood serum and thus increasing the ratio of tryptophan to BCAAs [8,31,32]. Franklin and Odontiadis [27] reported increased sensitivity of central serotonin 2A (5-HT_{2A}) receptors in rats fed a diet supplemented with chromium picolinate at dose 100 mg/kg. Our research also showed an increase in plasma dopamine levels in chickens receiving a diet with Cr in the amount of 3 mg/kg. Due to the interaction of serotonin and dopamine through direct synaptic connections [33,34] and through physical heterocomplexes of 5-HT_{2A} and DA₂ receptors [35,36], it is possible that chromium may also indirectly affect dopamine synthesis via the 5-HT system. Literature data indicate that the addition of Cr to the diet of rats at dose 100 mg/kg increased both serotonin and noradrenaline levels [27]. Our study found with an increase in plasma serotonin levels in chickens receiving Cr in their diet, but in contrast with the results reported by Franklin [27], noradrenaline levels decreased.

The blood glucose level is regulated not only by insulin but also by the histamine system [37,38]. Our study showed a decrease in the plasma histamine level of chickens receiving Cr at 3 mg/kg, irrespective of the form used. It is likely that Cr, by increasing the plasma insulin level, causes a decrease in the concentration of histidine, which is a precursor of histamine. In addition to the direct involvement of histamine receptors in the regulation of blood glucose, several studies have shown that the activation or deactivation of histamine receptors appears to have a modulating role in the regulation of the blood glucose level [38].

Our study showed an increase in the T4 level in the plasma of chickens receiving Cr in the amount of 6 mg/kg Cr-Pic. Sahin et al. [13] noted an increase in the concentration of T3 and T4 in heat-stressed chickens fed a diet with 0.4 mg/kg g Cr in the form of Cr picolinate. Taha et al. [39] reported that the addition of Cr to water (30 mg/L) for chickens did not cause an increase in serum T3 or T4. These results are consistent with those obtained by Al-Mashhadani et al. [40], who found that dietary supplementation with chromium yeast (0.5–2 mg/kg) had no significant effect on T3 and T4 levels. According to Sahin et al. [9], the addition of Cr to the diet of chickens (220–1200 µg/kg) reared under stress improves growth performance by regulating thyroid hormone metabolism (increased secretion of T3 and T4).

In our study, the addition of Cr to the diet of chickens increased the concentration of Ca and Fe and decreased the concentration of Cu and Zn in their blood plasma. Similarly, Gubajdullina et al. [41] found that supplementation of a chicken's diet with chromium (III) oxide nanoparticles at 50–400 µg/kg caused an increase in Fe and Ca content, while a decrease in Zn and Cu content in the body of birds. Iron is a cofactor for tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase, enzymes that are responsible for dopamine and serotonin synthesis, respectively [42], while magnesium affects norepinephrine level [43]. Uyanik et al. [44] found that the addition of CrCl₃ to the diet of Japanese quail at 100 mg/kg did not affect the level of Ca, but increased the plasma Mg concentration. Similarly, Ebrahimzadeh et al. [15], after giving chickens chromium methionine chelate at 200, 400, and 800 ppb, noted no effect on the level of Ca and P in the blood plasma. Amatya et al. [45] found no effect of Cr supplementation in the form of potassium chromate, chromium chloride, or chromium-yeast complex on Zn and Fe levels in chicken blood plasma, but noted an increase in Cu levels. Research by Onderci et al. [16]

indicates that the addition of Cr to the diet of laying hens increases the level of Fe in the blood, but also increases the level of Zn.

There is high individual variation among birds, which means that results of enzyme activity analyses fall within broad ranges. This poses significant difficulties in establishing physiological norms for enzyme activity in this group of animals. Their activity can increase both in the case of oxidative stress and under the influence of beneficial stimulation of the antioxidant system. To properly interpret the direction of changes, special attention should be paid to the level of other indicators, including MDA [46]. Our research shows that the addition of Cr to the diet of chickens at both 3 and 6 mg/kg, irrespective of the form used, increased MDA levels in the liver. The higher dose of Cr, i.e., 6 mg/kg, increased lipid peroxidation in both the liver and breast muscle, as evidenced by increased LOOH levels. The changes in the activity of antioxidant enzymes noted in our study (reduced SOD activity and higher CAT activity in the liver and breast muscle in the case of the higher dose of Cr) were the body's response to the intensification of oxidative processes due to the addition of Cr to the diet. The increase in oxidative processes in both the liver and breast muscle was greater when Cr was used in the form of nanoparticles. According to Onderci et al. [16], Cr exhibits antioxidant capacity, which the authors demonstrated in a study on laying hens exposed to heat stress. The authors noted lower MDA levels in the blood of stressed laying hens receiving a Cr supplement. Our research has shown that the effect of a Cr supplement on redox status varied in different tissues: It was found to have an antioxidant effect in the blood [24], but a pro-oxidative effect in the liver and breast muscle. There are reports confirming the pro-oxidative effect of Cr. According to Fan et al. [47], the addition of Cr to the diet of chickens causes an increase in MDA levels and a decrease in antioxidant enzyme activity. The varied impact of Cr on redox status may depend on the length of exposure and the possibility of accumulation of this element in a given tissue. Changes noted in the activity of antioxidant enzymes may also be linked to the level of microelements, such as Fe, Cu, and Zn. Copper and zinc are SOD cofactors, while Fe is a CAT cofactor [46]. Reducing the level of micronutrients may be the result of increased use of these enzymes in antioxidant reactions.

5. Conclusions

The addition of Cr in the form of both Cr-Pic and Cr-NP was found to increase the level of serotonin at a dose of just 3 mg/kg and, at the same time, reduce the level of noradrenaline. The addition of Cr at 3 mg/kg, irrespective of the form used, regulated the level of hormones of carbohydrate metabolism (increasing insulin levels and reducing glucagon levels) and had an adverse effect on the antioxidant status of the liver and breast muscle. Due to the adverse effect of Cr at 3 mg/kg on the antioxidant status of chickens, this level of Cr should not be considered in both forms Cr-Pic and Cr-NP as a feed additive for broiler chickens. In the future, studies on the potential beneficial effects of Cr on the organism should take into account doses lower than 3 mg/kg.

Author Contributions: Conceptualization, A.S. and K.O.; Methodology, J.J., K.O. and A.S.; Software, A.D. and K.K.; Validation, K.K., J.J.; Formal analysis, A.S., K.O. and A.D.; Investigation, A.S., A.D., K.K., K.O. and J.J.; Resources, J.J. and K.O.; Data curation, A.S., A.D., K.K., K.O., and J.J.; writing—original draft preparation, A.S.; Writing—Review and editing, K.O. and J.J.; Visualization, A.S.; Supervision, J.J.; Project administration, A.S., J.J. and K.O.; Funding acquisition, J.J. and K.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Ministry of Science and Higher Education: the University of Warmia and Mazury (no. 11.610.004-300) and the University of Life Sciences in Lublin (no. ZKT/S/20/2019/ZiR).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zha, L.Y.; Xu, Z.R.; Wang, M.; Gu, L.Y. Effects of chromium nanoparticle dosage on growth, body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2007**, *8*, 323–330. [[CrossRef](#)]

2. Lewicki, S.; Zdanowski, R.; Krzyżowska, M.; Lewicka, A.; Dębski, B.; Niemcewicz, M.; Goniewicz, M. The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2014**, *21*, 331–335. [[CrossRef](#)]
3. Perai, A.H.; Kermanshahi, H.; Nassiri Moghaddam, H.; Zarban, A. Effects of supplemental vitamin c and chromium on metabolic and hormonal responses, antioxidant status, and tonic immobility reactions of transported broiler chickens. *Biol. Trace Elem. Res.* **2014**, *157*, 224–233. [[CrossRef](#)]
4. Sahin, K.; Kucuk, O.; Sahin, N.; Ozbey, O. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on egg production, egg quality and serum concentrations of insulin, corticosterone, and some metabolites of Japanese quails. *Nutr. Res.* **2001**, *21*, 1315–1321. [[CrossRef](#)]
5. Cefalu, W.T.; Hu, F.B. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diab. Care* **2004**, *27*, 2741–2751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cefalu, W.T.; Rood, J.; Pinsonat, P.; Qin, J.; Sereda, O.; Levitan, L.; Anderson, R.A.; Zhang, X.H.; Martin, J.M.; Martin, C.K.; et al. Characterization of the metabolic and physiologic response to chromium supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **2010**, *59*, 755–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. McLeod, M.N.; Gaynes, B.N.; Golden, R.N. Chromium potentiation of antidepressant pharmacotherapy for dysthymic disorder in 5 patients. *J. Clin. Psychiatry* **1999**, *60*, 237–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Attenburrow, M.J.; Odontiadis, J.; Murray, B.J.; Cowen, P.J.; Franklin, M. Chromium treatment decreases the sensitivity of 5-HT_{2A} receptors. *Psychopharmacology* **2002**, *4*, 432–436.
9. 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*, 53–64. [[CrossRef](#)]
10. Cogburn, L.A.; Liou, S.S.; Alfonso, C.P.; McGuinness, M.C.; McMurtry, J.P. Dietary thyrotropin-releasing hormone stimulates growth rate and increases the insulin: glucagon molar ratio of broiler chickens. *Soc. Experim. Biol. Med.* **1989**, *192*, 127–134. [[CrossRef](#)]
11. Yahav, S. The effect of constant and diurnal cyclic temperatures on performance and blood system of young turkeys. *J. Therm. Biol.* **1999**, *24*, 71–78. [[CrossRef](#)]
12. McNabb, F.M.A.; King, D.B. Thyroid hormones effect on growth development and metabolism. In *The Endocrinology of Growth Development and Metabolism in Vertebrates*; Schreiberman, M., Scanes, C., Pang, P.K.T., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1993; Volume 10, pp. 873–885.
13. Sahin, K.; Sahin, N.; Kucuk, O. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high environmental temperature (32 °C). *Nutr. Res.* **2003**, *23*, 225–238. [[CrossRef](#)]
14. Navidshad, B.; Pirsaraei, Z.A.; Chashnidel, Y. Effects of dietary chromium polynicotinate supplementation on performance, fat deposition and plasma lipids of broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* **2010**, *9*, e13. [[CrossRef](#)]
15. Ebrahimzadeh, S.; Farhoomand, P.; Noori, K. Effects of chromium methionine supplementation on performance, carcass traits, and the Ca and P metabolism of broiler chickens under heat-stress conditions. *J. Appl. Poult. Res.* **2013**, *22*, 382–387. [[CrossRef](#)]
16. Onderci, M.; Sahin, N.; Sahin, K.; Kilic, N. Antioxidant properties of chromium and zinc: in vivo effects on digestibility, lipid peroxidation, antioxidant vitamins, and some minerals under a low ambient temperature. *Biol. Trace Elem. Res.* **2003**, *92*, 139–150. [[CrossRef](#)]
17. Tezuka, M.; Momiyama, K.; Edano, T.; Okada, S. Protective effect of chromium(III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J. Inorg. Biochem.* **1991**, *42*, 1–8. [[CrossRef](#)]
18. Preuss, H.G.; Jarrell, S.T.; Scheckenbach, R.; Lieberman, S.; Anderson, R.A. Comparative effects of chromium, vanadium and gymnema sylvestre on sugar-induced blood pressure elevations in SHR. *J. Am. Coll. Nutr.* **1998**, *17*, 116–123. [[CrossRef](#)]
19. Ognik, K.; Dražbo, A.; Stepniowska, A.; Kozłowski, K.; Listos, P.; Jankowski, J. The effect of chromium nanoparticles and chromium picolinate in broiler chicken diet on the performance, redox status and tissue histology. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
20. Greenwald, R.A. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1985.
21. Bartosz, G. *Second Face of Oxygen*; PWN: Warszawa, Poland, 2004.
22. Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **1978**, *52*, 302–310.
23. Salih, A.M.; Smith, D.M.; Price, J.F.; Dawson, L.E. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult. Sci.* **1987**, *66*, 1483–1488. [[CrossRef](#)]

24. Mottalib, A.; Zilani, G.; Suman, T.I.; Ahmed, T.; Islam, S. Assessment of Trace Metals in Consumer Chickens in Bangladesh. *J. Health Pollut.* **2018**, *8*, 181208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lein, T.F.; Horng, Y.M.; Yang, K.H. Performance, serum characteristics, carcass traits and lipid metabolism of broilers as effected by supplements of chromium picolinate. *Poult. Sci.* **1999**, *40*, 357–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ahmad, F.; Javed, M.T.; Sandhu, M.A.; Kausar, R. Effects of higher levels of chromium and copper on broiler health and performance during the peak tropical summer season. *Vet. Arh.* **2004**, *74*, 395–408.
27. Franklin, M.; Odontiadis, J. Effects of treatment with chromium picolinate on peripheral amino acid availability and brain monoamine function in the rat. *Pharmacopsychiatry* **2003**, *5*, 176–180. [[CrossRef](#)]
28. Hua, Y.; Clark, S.; Ren, J.; Sreejayan, N. Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *4*, 313–319. [[CrossRef](#)]
29. Wang, Z.Q.; Zhang, X.H.; Russell, J.C.; Hulver, M.; Cefalu, W.T. Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling in vivo in obese, insulinresistant JCR:LA-cp rats. *J. Nutr.* **2006**, *2*, 415–420. [[CrossRef](#)]
30. Yildiz, A.Ö.; Parlat, S.S.; Yazgan, O. The effects of organic chromium supplementation on production traits and some serum parameters of laying quails. *Rev. Méd. Vét.* **2004**, *155*, 642–646.
31. Brownley, K.A.; Boettiger, C.A.; Young, L.; Cefalu, W.T. Dietary chromium supplementation for targeted treatment of diabetes patients with comorbid depression and binge eating. *Med. Hyp.* **2015**, *85*, 45–48. [[CrossRef](#)]
32. Komorowski, J.R.; Tuzcu, M.; Sahin, N.; Juturu, V.; Orhan, C.; Ulas, M.; Sahin, K. Chromium picolinate modulates serotonergic properties and carbohydrate metabolism in a rat model of diabetes. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *149*, 50–56. [[CrossRef](#)]
33. Di Giovanni, G.; Di Matteo, V.; Pierucci, M.; Esposito, E. Serotonin-dopamine interaction electrophysiological evidence. *Prog. Brain Res.* **2008**, *172*, 45–71.
34. Van Bockstaele, E.J.; Cestari, D.M.; Pickel, V.M. Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Res.* **1994**, *2*, 307–322. [[CrossRef](#)]
35. De Bartolomeis, A.; Buonaguro, E.F.; Iasevoli, F. Serotonin-glutamate and serotonin-dopamine reciprocal interactions as putative molecular targets for novel antipsychotic treatments: from receptor heterodimers to postsynaptic scaffolding and effector proteins. *Psychopharmacology* **2013**, *1*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Albizu, L.; Holloway, T.; Gonzalez-Maeso, J.; Sealon, S.C. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology* **2011**, *4*, 770–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Masaki, T.; Yoshimatsu, H. Neuronal histamine and its receptors in obesity and diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* **2007**, *3*, 212–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sim, Y.B.; Park, S.H.; Kim, S.S.; Kim, C.H.; Kim, S.J.; Lim, S.M.; Jung, J.S.; Ryu, O.H.; Choi, M.G.; Suh, H.W. The modulatory role of spinally located histamine receptors in the regulation of the blood glucose level in d-glucose-fed mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *18*, 41–46. [[CrossRef](#)]
39. Taha, N.M.; Mandour, A.A.; Habeila, O.H. Biochemical effect of chromium element on lipid profile of broilers. *Alex. J. Vet. Sci.* **2013**, *39*, 74–81.
40. Al-Mashhadani, H.E.; Ibrahim, K.D.; AlBandr, K.L. Effect of supplementing different levels of chromium yeast to diet on broiler chickens on some physiological traits. *Int. Poult. Sci.* **2010**, *9*, 376–381.
41. Gubajdullina, I.Z.; Gavrish, I.A.; Lebedev, S.V. Effect of metallic nanoparticles on exchange of chemical elements in broiler chickens. *Iop Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2019**, *341*, 012169. [[CrossRef](#)]
42. Jonghan Kim, J.; Wessling-Resnick, M. Iron and Mechanisms of Emotional Behavior. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 1101–1107.
43. Pasternak, K.; Dabrowski, W.; Wyciszczok, T.; Korycińska, A.; Dobija, J.; Biernacka, J.; Rzecki, Z. The relationship between magnesium, epinephrine and norepinephrine blood concentrations during CABG with normovolemic hemodilution. *Magnes Res.* **2005**, *18*, 245–252.
44. Uyanik, F.; Eren, M.; Kocaoglu, B.; Sahin, N. Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites and tissue chromium levels of Japanese quails. *Biol. Trace Elem. Res.* **2005**, *103*, 187–197. [[CrossRef](#)]

45. Amatya, I.L.; Haldar, S.; Ghosh, T.K. Effects of chromium supplementation from inorganic and organic sources on nutrient utilization, mineral metabolism and meat quality in broiler chickens exposed to natural heat stress. *Anim. Sci.* **2004**, *79*, 241–253. [[CrossRef](#)]
46. Ognik, K.; Krauze, M. The potential for using enzymatic assays to assess the health of turkeys. *World Poult. Sci. J.* **2016**, *72*, 535–550. [[CrossRef](#)]
47. Fan, W.T.; Zhao, X.N.; Cheng, J.; Liu, Y.H.; Liu, J.Z. Oxidative stress and hepatocellular injury induced by oral administration of Cr³⁺ in chicken. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2015**, *29*, 280–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).