

УДК: 615.324.099:595.3
DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.214

ОЦЕНКА ОБЩЕЙ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ДИАТОМИТА IN VIVO

Балыкина А.Б. * – канд. ветеринар. наук, доц. каф. биохимии и физиологии (ORCID 0000-0001-5373-4794); **Карпенко Л.Ю.** – д-р биол. наук, проф., зав. каф. биохимии и физиологии (ORCID 0000-0002-2781-5993); **Киянчук М.В.** – асс. каф. биохимии и физиологии (ORCID 0009-0006-2884-9630); **Никонов И.Н.** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-9495-0178)

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

*andreeva-a-83@mail.ru

Ключевые слова: хитозан, *Danio rerio*, *Paramecium caudatum*, общая токсичность, острая токсичность.

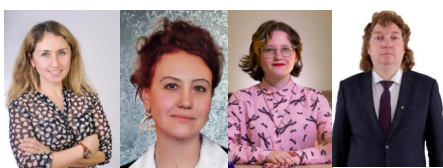
Keywords: chitosan, *Danio rerio*, *Paramecium caudatum*, general toxicity, acute toxicity.

Финансирование: При поддержке: исследование выполнено при поддержке гранта российского научного фонда № 25-26-00175 Молекулярно-генетические механизмы формирования иммунитета и микробиома рубца у молодняка крупного рогатого скота под влиянием хитозана (<https://grant.rscf.ru/site/user/bids?role=master>).

Поступила: 12.08.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Хитозан и его производные также используются в фармацевтике в качестве вспомогательного вещества, носителя лекарственного средства или терапевтического агента. Исследование проводили на базе кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Выполнили систематическое обобщение литературы по токсикологическим исследованиям хитозана (*in vitro* и *in vivo*). Целью данного исследования явилась проверка безопасности кормовой добавки, содержащей хитозан, методами биотестирования на общую токсичность. Экспериментальный образец кормовой добавки был наработан на основе диатомита обожженного (0,3-0,7 мм) и концентрата водорастворимого хитозана. Токсичность при многократном введении *in vivo*. Определяли общую токсичность и острую токсичность на *Danio rerio* согласно ГОСТу 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения общей токсичности». Инфузории содержались в среде Лозина-Лозинского, приготовленной по ГОСТу 31674-2012. Проводили оценку влияния водного экстракта на тест-систему в микроаквариумах, в качестве которых использовали иммунологические планшеты. Контроль за выживанием проводился с использованием светового микроскопа при увеличении 100х. Наблюдения осуществлялись, как и в контрольном растворе так и в водном экстракте через 30 мин, 1 час, 2 часа

и 3 часа после начала эксперимента. Биотестирование проводилось с двойным повторением для каждой пробы. Выживаемость инфузорий через 3 часа в водном экстракте неразведенного образца составляет 83%; выживаемость инфузорий через 3 часа в водном экстракте разведенного образца составляет 83%. Результаты исследований показали, что представленный образец кормовой добавки, содержащей хитозан и диатомит, является нетоксичным (безвредным). В статье также обсуждаются возможные механизмы токсического действия хитозана и рекомендации по безопасному применению в ветеринарии.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Во всём мире наблюдается повышенный интерес к использованию биоактивных молекул, таких как хитозан, в качестве лечебно-профилактического средства [1,2,3,4]. Благодаря своей биоразлагаемости, биологической совместимости, антимикробным свойствам, антиоксидантной активности и высокой безопасности хитозан потенциально может применяться в самых разных областях, в том числе в сельском хозяйстве в целях улучшения молочной, мясной продуктивности и повышения резистентности организма животных к инфекционным болезням [5,6, 7, 8].

Олигосахарид хитозана является основным продуктом распада хитина (часто применяется панцирь омара *Panurilus argus*) в результате химического гидролиза или ферментативного распада с участием процессов деацетилирования и деполимеризации [9, 10].

Несмотря на то, что существует множество данных об оценке токсичности неорганических наночастиц, знания о биоразлагаемых наноматериалах, которые всегда считались безопасными, по-прежнему ограничены [11]. Возможности применения хитозана сильно ограничены из-за его чрезвычайно твёрдой кристаллической структуры: он нерастворим при уровне pH выше или равном 7. Это обуславливает необходимость производство легко усваиваемых композиций на основе хитозана [12].

Хитозан способен восстановить фосфорно-кальциевый баланс и защитить функции печени, почек и мозга. Он также снижает уровень кадмия в печени, почках и мозге, а также в костях крыс в экспериментах по оценке действия хитозана [13]. Хитозан обладает локальной биологической активностью в виде гемо-

статического действия и, наряду со способностью активировать макрофаги и вызывать стимуляцию выработки цитокинов (что вызывает интерес к его применению в ветеринарии), может стать объектом более тщательной оценки его безопасности в качестве биологической добавки для крупного рогатого скота [12]. Наночастицы хитозана широко используются в качестве полимерных носителей лекарственных средств в составе наночастиц благодаря их способности повышать эффективность и безопасность доставки лекарств [13].

Важным критерием для использования хитозана является отсутствие токсичности, поэтому данное исследование посвящено изучению общей токсичности и острой токсичности хитозана с целью дальнейшего его применения в животноводстве. Несмотря на наличие значительного количества исследований в области применения хитозана, всё ещё нет достаточного количества достоверных данных по применению в сельском хозяйстве. Перед оценкой влияния хитозана на молочную и мясную продуктивность крупного рогатого скота необходимо оценить токсичность на лабораторных биологических моделях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Целью данного исследования явилась проверка безопасности кормовой добавки, содержащей хитозан, методами биотестирования на общую токсичность. Экспериментальный образец кормовой добавки был наработан на основе диатомита обожженного (0,3-0,7 мм) и концентрата водорастворимого хитозана. Токсичность при многократном введении *in vivo* включает оценку неблагоприятных эффектов, возникающих в результате повторного ежедневного воздействия дозы вещества

в течение определенного периода времени до ожидаемой продолжительности жизни подопытных животных.

Исследование проводили на базе кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Определяли общую токсичность и острую токсичность на *Danio rerio*, согласно ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения общей токсичности».

При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения общей токсичности» и «Правила надлежащей лабораторной практики» (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 года N 199н).

Определение общей токсичности. Культивирование инфузории *Paramecium caudatum* производилось по «ГОСТу 31674-2012. Корма, комбикорма, кормовое сырьё. Методы определения общей токсичности».

Осуществляли перевод инфузорий на дрожжевой корм. Инфузории содержались в среде Лозина-Лозинского, приготовленной по ГОСТу 31674-2012, при температуре 25 °С и искусственном освещении. Состав среды Лозина-Лозинского, следующий: на 1 л d H₂O, NaCl – 0,1 г; KCl – 0,01 г; CaCl₂ – 0,01 г; MgCl₂ – 0,01 г; NaHCO₃ – 0,02 г. [2].

Проводили оценку влияния водного экстракта на тест-систему в микроаквариумах, в качестве которых использовали иммунологические планшеты.

Водный экстракт готовили следующим образом: 10 г пробы помещали в стеклянную емкость для экстракции, добавляли 50 мл среды для культивирования и интенсивно встряхивали в течение 2 минут. Затем, после 10 минут отстаивания, смесь снова встряхивали в течение 2 минут и оставляли отстаиваться на 15-20 минут. Надосадочную жидкость отбирали с помощью шприца и фильтровали через

бумажный фильтр.

Контроль за выживанием проводился с использованием светового микроскопа при увеличении 100х. Наблюдения осуществлялись, как и в контрольном растворе так и в водном экстракте через 30 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа после начала эксперимента.

Биотестирование проводилось с двойным повторением для каждой пробы. Токсичность образца оценивалась по времени, необходимого для гибели инфузорий. Проба классифицировалась как остротоксичная, если гибель происходила в течение 30 минут, токсичная – если в период от 31 до 60 минут, слаботоксичная – от 1 до 3 часов, нетоксичная – если гибели не наблюдалось в течение трех часов.

Острая токсичность определялась в ходе эксперимента с использованием взрослых особей *Danio rerio* (6,5 месяцев, масса - 0,35±0,01) дикого типа.

Животные содержались в аквариумах при уровне освещения 300-330 лк и фотопериоде 14 часов светлых и 10 часов темных периодов. Температура воды поддерживалась на уровне 27 ± 0,5 °С. Кормление проводилось дважды в день ежедневно сухими гранулами корма и один раз в три дня *Artemia* sp.

В аквариумы была добавлена кормовая добавка в дозе 5,0-0,313 г/л. В ходе эксперимента было изготовлено три концентрации исследуемого комплекса, отличающихся в 2,0 раза. Исследования проводились в соответствии с рекомендациями OECD 203. Рыбы размещались в трехлитровых поликарбонатных резервуарах, по восемь особей в каждом аквариуме (n=48). Распределение рыб по резервуарам осуществлялось в следующем количестве:

Исследования проводили согласно рекомендациям OECD 203. Рыбы помещались в 3-х литровые поликарбонатные резервуары (8 особей в каждом аквариуме, n=48).

Рыб распределяли в резервуары в следующем количестве:

Для каждой концентрации испытуемого вещества в аквариуме содержалось по

8 рыб.

В качестве контрольной группы для мониторинга качества воды в аквариуме использовалось тоже 8 рыб.

Температура в аквариумах с рыбами стабильно поддерживалась на уровне 27° С с погрешностью ± 0,5°С, а продолжительность светового дня составляла 14 часов при 10 часах темноты (интенсивность освещения - 300 люкс). Ежедневно осуществлялись измерения рН, концентрации растворенного кислорода и температуры.

Уровень смертности в контрольных группах оставался ниже 10%, что согласуется с показателями OECD 203.

Каждые 24 часа в ходе исследования проводился осмотр групп рыб. Рыба признавалась погибшей при обнаружении характерных внешних признаков: неподвижность жаберных крышек и отсутствие реакции на раздражение хвостового стебля. Помимо смертности, наблюдали за изменениями в поведении рыб, а также за появлением пигментации.

В ходе экспериментальных исследова-

ний оценивались следующие токсикологические показатели: максимальная безвредная концентрация, которая не привела к гибели особей в течение эксперимента; минимальная концентрация, способная вызвать 100% летальность в течение эксперимента; общий процент погибших особей для каждой концентрации в установленный период наблюдения; значения LC50 через 96 часов с 95% доверительным интервалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Результаты определения общей токсичности на тест -системах, представлены в Таблице 1 и 2.

Выживаемость инфузорий через 3 часа в водном экстракте неразведенного образца составляет 83%; выживаемость инфузорий через 3 часа в водном экстракте разведенного образца составляет 83%. Исследуемый образец можно считать нетоксичным.

Результаты определения острой токсичности хитозана на *Danio rerio* представлены в Таблице 3.

Таблица 1 – Выживаемость инфузорий *Paramecium caudatum* при внесении тестируемого комплекса, двух разных концентраций

Выживаемость инфузорий в контрольном растворе					
Время	Номер лунки в микроаквариуме				
	I	II	III	IV	V
В начале опыта	6	6	6	6	6
Через 30 минут	6	6	6	6	6
Через 1 ч.	6	6	6	6	6
Через 2 ч.	6	6	6	6	6
Через 3 ч.	5	6	6	6	6
Выживаемость инфузорий в водном экстракте					
Время	Номер лунки в микроаквариуме				
	I	II	III	IV	V
В начале опыта	6	6	6	6	6
Через 30 минут	6	6	6	6	6
Через 1 час	6	6	5	6	6
Через 2 часа	5	6	5	6	6
Через 3 часа	5	6	5	6	6

Таблица 2 – Выживаемость инфузорий *Paramecium caudatum* при внесении тестируемого комплекса в 3-х кратном разведении

Выживаемость инфузорий в водном экстракте					
Время	Номер лунки в микроаквариуме				
	I	II	III	IV	V
В начале опыта	6	6	6	6	6
Через 30 минут	6	6	6	6	6
Через 1 час	6	6	6	6	6
Через 2 часа	6	6	6	6	6
Через 3 часа	6	6	6	5	6

Таблица 3 – Данные о выживаемости *Danio rerio* при внесении тестируемого комплекса

Концентрация, г/л	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	Кол-во погибших рыб, %
5,0	0	0	0	0	0
2,50	0	0	0	0	0
1,25	0	0	0	0	0
0,625	0	0	0	0	0
0,313	0	0	0	0	0
Контроль	0	0	0	0	0

При применении изучаемого образца хитозана с диатомитом в концентрациях 5,0-0,313 г/л нами не зарегистрирована гибель рыб. Их состояние, при использовании данных концентраций, рассматривалось как удовлетворительное: реакция на внешние раздражители была адекватной (реакция избегания сачка - положительная); потребление корма в пределах физиологической нормы; чешуя плотно прилегает к телу; изменение в состоянии чешуи не отмечено; слизистые оболочки розовые, без видимых патологических изменений.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Проведено определение общей токсичности на тест-объекте *Paramecium caudatum* и исследование острой токсичности тест объекте *Danio rerio*. Результаты исследований показали, что представленный образец кормовой добавки, содержащей хитозан и диатомит в дозе 5,0-0,313 г/л, является нетоксичным (безвредным). Полученные данные позволяют продолжить исследования для дальнейшего внедрения исследуемого комплекса в схему лечебно-профилактических мероприятий в ветери-

нарии.

ASSESSMENT OF THE GENERAL AND ACUTE TOXICITY OF A CHITOSAN AND DIATOMITE-BASED FODDER ADDITIVE IN VIVO

Balykina A.B. – PhD of Veterinary Sciences, Assoc. Prof. (ORCID 0000-0001-5373-4794); **Karpenko L.Yu** – D.Biol.sc. Professor (ORCID 0000-0002-2781-5993); **Kiyanchuk M.V.** – assistant of the Department of Biochemistry and Physiology (ORCID 0009-0006-2884-9630); **Nikonov I.N.** – Cand.biol.sc. (ORCID 0000-0001-9495-0178)

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

Financing: The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant 25-26-00175 Molecular genetic mechanisms of immunity formation and the rumen microbiome in young cattle under the influence of chitosan. (<https://grant.rscf.ru/site/user/bids?role=master>)

ABSTRACT

Chitosan and its derivatives are also

used in pharmaceuticals as an excipient, a carrier of a drug or a therapeutic agent. The study was conducted on the basis of the Department of Biochemistry and Physiology of the St. Petersburg State University of Veterinary Medicine. A systematic review of the literature on toxicological studies of chitosan (*in vitro* and *in vivo*) was performed. The aim of this study was to test the safety of a feed additive containing chitosan using bioassay methods for general toxicity. An experimental sample of a feed additive was developed based on burnt diatomite (0.3-0.7 mm) and a concentrate of water-soluble chitosan. Toxicity during repeated administration *in vivo*. The general toxicity and acute toxicity of *Danio rerio* were determined in accordance with GOST 31674-2012 "Feed, compound feed, and feed raw materials. Methods for determining general toxicity." The infusoria were kept in a Lozin-Lozinsky medium prepared according to GOST 31674-2012. The effect of the aqueous extract on the test system was evaluated in microaquaria using immunological plates. Survival control was performed using a light microscope at a magnification of 100x. Observations were made in both the control solution and the aqueous extract 30 minutes, 1 hour, 2 hours, and 3 hours after the start of the experiment. The biotesting was performed with double repetition for each sample. The survival rate of ciliates after 3 hours in an aqueous extract of the undiluted sample is 83%; the survival rate of ciliates after 3 hours in an aqueous extract of the diluted sample is 83%. The results of the studies showed that the presented sample of a feed additive containing chitosan and diatomite is non-toxic (harmless). The article also discusses possible mechanisms of the toxic effect of chitosan and recommendations for safe use in veterinary medicine.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Балькина А.Б., Карпенко Л.Ю., Киянчук М.В., Никонов И.Н. Физиолого-биохимические аспекты применения Хитозана в ветеринарии. *Международный вестник ветеринарии*. – 2025. – № 3. – С. 385-277.
2. Hematological characteristics in pregnant Saanen goats / P. Bokhan, A. Bakhta, L. Karpenko [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2019. – Vol. 54, No. S3. – P. 107-108. – EDN OXJEIU.
3. Токсикологическая оценка биопрепарата для компостирования / И. А. Махнин, Л. Ю. Карпенко, И. Н. Никонов [и др.] // *Неделя науки ИЭИТ : материалы Всероссийской конференции, Санкт-Петербург, 18–23 ноября 2024 года*. – Санкт-Петербург: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого", 2024. – С. 230-232. – EDN KUXDFG.
4. Mycotoxin eliminator "Elitox" in last trimester pregnant cows' application impact on immune blood profile of offspring / A. Kozitsyna, L. Karpenko, A. Bakhta [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2018. – Vol. 53, No. S2. – P. 153. – EDN YKVL I
5. Meramo-Hurtado S, Ceballos-Arrieta N, Cortes-Caballero J, Leon-Pulido J, Gonzalez-Quiroga A, Gonzalez-Delgado AD. Inherent Safety Assessment of Industrial-Scale Production of Chitosan Microbeads Modified with TiO₂ Nanoparticles. *Biomolecules*. 2021 Apr 13;11(4):568. doi: 10.3390/biom11040568. PMID: 33924286; PMCID: PMC8068982.
6. Salsabila S, Khairinisa MA, Wathoni N, Sufiawati I, Mohd Fuad WE, Khairul Ikram NK, Muchtaridi M. In vivo toxicity of chitosan-based nanoparticles: a systematic review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2025 Dec;53(1):1-15. doi: 10.1080/21691401.2025.2462328. Epub 2025 Feb 9. PMID: 39924869.
7. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Zabermawi NM, Arif M, Batiha GE, Khafaga AF, Abd El-Hakim YM, Al-Sagheer AA. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int J Biol Macromol*. 2020 Dec 1;164:2726-2744. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153. Epub 2020 Aug 22. Retraction in: *Int J Biol Macromol*. 2025 Mar;293:139051. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139051. PMID: 32841671

8. Abdollahimajd F, Pourani MR, Mahdavi H, Mirzadeh H, Younespour S, Moravvej H. Efficacy and safety of chitosan-based biocompatible dressing versus nanosilver (Acticoat™) dressing in treatment of recalcitrant diabetic wounds: A randomized clinical trial. *Dermatol Ther.* 2022 Sep;35(9):e15682. doi: 10.1111/dth.15682. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35778935.
 9. Lagarto A, Merino N, Valdes O, Dominguez J, Spencer E, de la Paz N, Aparicio G. Safety evaluation of chitosan and chitosan acid salts from *Panurilus argus* lobster. *Int J Biol Macromol.* 2015 Jan;72:1343-50. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.030. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25450835.
 10. Naveed M, Phil L, Sohail M, Hasnat M, Baig MMFA, Ihsan AU, Shumzaid M, Karkar MU, Mehmood Khan T, Akabar MD, Hussain MI, Zhou QG. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *Int J Biol Macromol.* 2019 May 15;129:827-843. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30708011.
 11. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010 Apr;56(3):290-9. doi: 10.1016/j.yrtph.2009.09.015. Epub 2009 Sep 27. PMID: 19788905.
 12. Pramanik S., Sali V. Connecting the dots in drug delivery: A tour d'horizon of chitosan-based nanocarriers system. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021;169:103–121. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.083.
- REFERENCES**
1. Balykina A.B., Karpenko L.Yu., Kiyanchuk M.V., Nikonov I.N. Physiological and biochemical aspects of the application of Chitosan in veterinary medicine. *International Bulletin of Veterinary Medicine.* – 2025. – No. 3. – Pp. 385-277. (In Russ.)
 2. Hematological characteristics in pregnant Saanen goats / P. Bokhan, A. Bakhta, L. Karpenko [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals.* – 2019. – Vol. 54, No. S3. – Pp. 107-108. – EDN OXJEIU. (In Russ.)
 3. Toxicological assessment of a biopreparation for composting / I. A. Makhnin, L. Yu. Karpenko, I. N. Nikonov [et al.] // *Week of Science at IEIT: Proceedings of the All-Russian Conference, St. Petersburg, November 18–23, 2024.* – St. Petersburg: Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University", 2024. – Pp. 230-232. – EDN KUXDFG. (In Russ.)
 4. The effect of the mycotoxin eliminator "Elitox" on the immune profile of the offspring in pregnant cows in the last trimester of pregnancy / A. Kozitsyna, L. Karpenko, A. Bakhta [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals.* – 2018. – Vol. 53, No. S2. – P. 153. – YKVL I Publishing House
 5. Meramo-Hurtado S, Ceballos-Arrieta N, Cortez-Caballero J, Leon-Pulido J, Gonzalez-Quiroga A, Gonzalez-Delgado A. Assessment of the internal safety of industrial production of chitosan microbeads modified with TiO₂ nanoparticles. *Biomolecules.* April 13, 2021;11(4):568. doi: 10.3390/biom11040568. PMID: 33924286; PMCID: PMC8068982.
 6. Salsabila S., Khairinisa M., Watoni N., Sufiawati I., Mohd Fuad V., Khairul Ikram N.K., Mughtaridi M. Toxicity of chitosan-based nanoparticles in vivo: a systematic review. *Biotechnology of Artificial Cells Nanomed.* 2025 December;53(1):1-15. doi: 10.1080/21691401.2025.2462328. Published on February 9, 2025. PMID: 39924869.
 7. Abd El-Hack Y, El-Saadon MT, Shafi Y, Zaber mawi NM, Arif M, Batihah J, Hafaga AF, Abd El-Hakim YM, Al-Sagir AA. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: a review. *Int J Biol Macromol.* 2020 Dec 1;164:2726-2744. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153. Published on August 22, 2020. Published in: *Int J Biol Macromol.* 2025, March;293:139051. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139051. Identification number: 32841671
 8. Abdollahimajd F., Purani M., Mahdavi H., Mirzadeh H., Younespour S., Moravvej H. Efficacy and Safety of Chitosan-Based Biocompatible Dressings Compared to Nanosilver Dressings (Acticoat™) in the Treatment of Refractory Diabetic Wounds: A Randomized Clinical Trial. *Dermatol.* 2022 Sep;35(9):e15682. doi: 10.1111/publication date:15682. Epub, 2022, July 25. Identifica-

tion number: 35778935.

9. Lagarto A, Merino N, Valdes O, Dominguez J, Spencer E, de la Paz N, Aparicio G. Safety assessment of chitosan and chitosan acid salts from the fungus *panurilus argus* Int J Biol Macromol. 2015 Jan; 72:1343-50. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.030. Epub 2014 October 24. PMID:25450835.

10. Naveed M, Phil left, Sohail m, Hasnat m, Baig MMFA, Ihsan au, Shumzaid m, Kakar mu, Mehmood t District, Akabar Dr, Hussain Mi, Zhou QG. Chitosan oligosaccharide (COS): an overview. Int J Biol Macromol. 2019 May 15;129:827-843. doi: 10.1016 / j.ijbiomac.2019.01.192. Epub 2019 Jan 29. PMID:30708011.

11. Hu YL, Qi W, Han F, Shao JZ, Gao JQ. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. Int J Nanomedicine. 2011;6:3351-9. doi: 10.2147/IJN.S25853. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22267920; PMCID: PMC3260029.

12. Boamah PO, Onumah J, Aduguba WO,

Santo KG. Application of depolymerized chitosan in crop production: A review. Int J Biol Macromol. 2023 Apr 30;235:123858. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123858. Epub 2023 Mar 4. PMID: 36871686.

13. Ait Hamdan Y, Ait Baba A, Azraida H, Kabdy H, Oudadesse H, Chait A, Rhazi M. In vivo evaluation by oral administration of chitosan combined with bioactive glass against cadmium-induced toxicity in rats. Int J Biol Macromol. 2024 Sep;276(Pt 1):133845. doi: 10.1016/ j.ijbiomac.2024.133845. Epub 2024 Jul 14. PMID: 39004258.

14. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. Regular toxicol herbs. 2010 Apr; 56 (3):290-9. doi:10.1016/ j.yrtph.2009.09.015. Epub 2009 Sep 27. PMID:19788905.

15. Pramanik S., Sali V. Interplay in Drug Delivery: A Review of Chitosan-Based Nanocarrier System. Int. J. Biol. Macromol. 2021;169:103-121. doi: 10.1016/ j.ijbiomac.2020.12.083.