

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki

mgr Ewelina Agnieszka Kulak

Biodystrybucja nanocząsteczek srebra oraz jego oddziaływanie na status
oksydoredukcyjny i immunologiczny kurcząt

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Praca wykonana
w Katedrze Biochemii i Toksykologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

PROMOTOR
dr hab. prof. nadzw. Katarzyna Ognik
PROMOTOR POMOCNICZY
dr Iwona Sembratowicz

RECENZENCI:
prof. dr hab. Zenon Zduńczyk
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
dr hab. prof. nadzw. Tomasz Niemiec
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Lublin, 2018

Streszczenie

Przedmiotem niniejszej dysertacji doktorskiej była weryfikacja hipotezy badawczej, że istnieją takie dawki nanocząstek srebra (Ag-NPs), które poprawiają obronę antyoksydacyjną i immunologiczną kurcząt nie pogarszając przy tym wyników wzrostowych oraz zdrowotnych. Założono również, że wielkość Ag-NPs w hydrokoloidzie oraz dawka aplikowana kurczętom ma wpływ na kumulację Ag w tkankach oraz odpowiedź immunologiczną i antyoksydacyjną organizmu.

W pierwszym etapie badań ustalono, które dawki Ag-NPs o wielkości 5 nm, spożyte przez kurczęta w efekcie różnego okresu aplikowania hydrokoloidów o stężeniu 5 lub 10 mg/L poprawiają obronę antyoksydacyjną i immunologiczną nie kumulując się przy tym i nie indukując procesów oksydacyjnych w tkankach. Natomiast w drugim etapie badań ustalono, w jaki sposób aplikowanie kurczętom hydrokoloidu zawierającego większe wielkości Ag-NPs wpłynie na kumulację tego pierwiastka w tkankach oraz na odpowiedź immunologiczną i antyoksydacyjną organizmu.

Stosowanie nanocząstek srebra w dawkach większych niż 9,47 mg/szt. indukuje reakcje oksydacyjne we krwi, ścianie jelita cienkiego, wątrobie i mięśniu piersiowym kurcząt. Limity bezpieczeństwa wyznaczone dla nanocząstek srebra w okresie hodowli (42 dni), wyrażone jako NOAEL, w odniesieniu do skutków stresu oksydacyjnego wynoszą 9,47 mg/szt. (4,12 mg/kg masy ciała dla m.c. = 2,30 kg), podczas gdy w odniesieniu do kumulacji Ag w mięśniu piersiowym wynoszą 63,74 mg/szt. (27,71 mg/kg masy ciała dla m.c. = 2,30 kg).

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	6
2. HIPOTEZA	9
3. CEL BADAŃ	9
4. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE	9
4.1. Nanocząstki srebra.....	9
4.2. Materiał badawczy.....	9
4.3. Metody badawcze	9
4.4. Procedury doświadczalne	11
4.5. Metodyka analityczna.....	11
4.6. Analiza statystyczna	12
4. WYNIKI BADAŃ	12
4.1. Wyniki wzrostowe kurcząt otrzymujących hydrokoloid nanocząstek srebra.....	12
4.2. Ocena biodystrybucji srebra w tkankach kurcząt	13
4.3. Status oksydoredukcyjny kurcząt otrzymujących hydrokoloid nanocząstek srebra.....	13
4.4. Status immunologiczny kurcząt otrzymujących hydrokoloid nanocząstek srebra	14
4.5. Ocena histologiczna jelita cienkiego kurcząt otrzymujących hydrokoloid nanocząstek srebra	14
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	15
ANEKS - TABELE	

1. WSTĘP

Nanocząstki z uwagi na małe rozmiary (poniżej 100 nm), a także dużą powierzchnię właściwą charakteryzują się znaczną reaktywnością chemiczną, tendencją do aglomeracji, porowatością oraz powinowactwem do szeregu struktur biologicznych. Ze względu na wyjątkowe właściwości fizykochemiczne, znalazły one szerokie zastosowanie w medycynie, jak również w rolnictwie i produkcji żywności.

Nanocząstki srebra mogą wnikać do organizmu czterema głównymi drogami: doustną, wziewną, przez skórę oraz do systemowo w przypadku interwencji zewnętrznych (np. iniekcji).

Aplikacja iniekcyjna skutkuje bezpośrednim kontaktem cząstek z krwią, gdzie ich powierzchnia jest pokrywana białkami, wliczając w to immunoglobuliny. Formowanie otoczki złożonej z białek osocza zapoczątkowuje proces rozpoznawania i wchłaniania nanocząstek przez komórki fagocytarne, a następnie szybkiego ich usuwania z krwi do organów. Największa kumulacja nanocząstek obserwowana jest w organach o wysokiej zawartości makrofagów takich jak wątroba i śledziona. Transport nanocząstek do wątroby i śledziony jest bardzo szybki, zachodzi w ciągu kilku minut. Jeżeli nanocząstki, aplikowane są do krwioobiegu w celach terapeutycznych, mają trafić do specyficznego organu, konieczne jest zniwelowanie działania systemu fagocytarnego. W tym celu cząsteczki przed podaniem powleka się specyficznymi substancjami np. przeciwciałami.

Nanocząstki srebra pobrane drogą inhalacyjną, osadzają się w górnych drogach oddechowych uszkodzając je poprzez bezpośredni kontakt z tkankami bądź mogą być doprowadzane przez krew do płuc. Biodystrybucja i rozmieszczenie cząstek srebra w drogach oddechowych zależą od różnych czynników, w tym od ich wielkości i pojemności płuc. Cząstki srebra o wielkości 5-30 μm są zatrzymywane w obszarze jamy nosowo-gardłowej, natomiast cząstki o wielkości 1-5 μm osadzają się w rejonie tchawicy. Nanocząstki mniejsze niż 1 μm mogą dzięki ruchom Browna dyfundować aż do pęcherzyków płucnych, a następnie być wchłaniane do krwioobiegu. Nanocząstki srebra wnikając drogą oddechową napotykać na barierę powietrze/krew. Po zaadsorbowaniu w płucach są one bardzo szybko dystrybuowane poprzez układ krwionośny do innych organów ciała.

Badania przeprowadzone na zwierzętach udowadniają, że nanocząstki srebra mogą również przechodzić przez warstwy naskórka do skóry właściwej, a następnie przenikać do krwioobiegu i układu limfatycznego. Najprawdopodobniej nanosrebro, po wniknięciu przez skórę, jest pochłaniane przez komórki dendrytyczne Langerhansa i fagocyty. Może również aktywować komórki tuczne tkanki łącznej (mastocyty) oraz komórki naskórka (keratynocyty), które wykazują zdolności fagocytowania nanocząsteczek i wywoływania odpowiedzi zapalnej.

Nanocząstki mogą również dostawać się do organizmu drogą pokarmową. Na efektywność tego procesu wpływa rodzaj i ilość treści pokarmowej, enzymów trawiennych, elektrolitów oraz mikroflory jelit, ponieważ nanocząsteczki srebra mogą wchodzić w interakcje z grupami funkcyjnymi składników pokarmowych. Kinetyczny mechanizm procesu wchłaniania nanosrebra nie jest do końca poznany. Wiadomo jednak, że bierze w tym udział tkanka limfatyczna jelit (kępki Peyera). Absorpcja może odbywać się także poprzez enterocyty, jak również przez przestrzenie międzykomórkowe. Na proces translokacji srebra wpływa nie tylko wielkość nanocząstek, lecz również ich ładunek powierzchniowy oraz nośniki.

Nanocząstki srebra po wniknięciu w obszar podśluzówkowy mogą przenikać zarówno do naczyń limfatycznych jak i włosowatych. Limfatyczna absorpcja nanocząstek indukuje odpowiedź immunologiczną, w wyniku której może dojść do zaburzenia wydzielniczych funkcji śluzówki. Jednocześnie nanocząstki wchodzące do naczyń włosowatych poprzez układ krwionośny są transportowane bezpośrednio do wątroby. W przypadku aplikowania nanosrebra drogą pokarmową znaczna ilość tego pierwiastka wydalana jest wraz z kałem, zaś we krwi stwierdza się jego niską zawartość.

Nanocząstki srebra po wchłonięciu do krwioobiegu łączą się z białkami osocza, takimi jak albuminy, apolipoproteiny, keratyny, czy metalotioneiny (MT). Różne drogi wnikania nanosrebra pełnią kluczową rolę w odpowiedzi biologicznej konkretnych organów. Srebro deponowane jest w różnych organach, takich jak wątroba, nerki, płuca, śledziona, serce, trzustka, jądra, jajniki, czy mózg.

Nanocząstki srebra po wejściu do komórki, początkowo umiejscawiane są głównie w pęcherzykach endocytarnych, następnie po uwolnieniu do cytoplazmy, są akumulowane w autofagosomie, z którego ponownie mogą zostać uwolnione i docelowo penetrować do innych organelli komórkowych. Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie dowodzą, że aż 75% masowych srebra znajduje się w cytoplazmie, a jedynie 25% w jądrze komórkowym.

Nagromadzenie nanosrebra w cytoplazmie może zaburzać funkcje mitochondriów poprzez ich uszkodzenie mechaniczne lub blokowanie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, w wyniku czego następuje zwiększona produkcja RFT. Dodatkowo jony srebra mogą zastępować żelazo w białkach i indukować reakcję Fentona, która prowadzi do generowania reaktywnych form tlenu. Z uwagi na duże powinowactwo srebra do grup siarkowych, pierwiastek ten łączy się w komórkach z glutationem (GSH), zaburzając jego funkcje antyoksydacyjne, tym samym zwiększa podatność komórki na działanie RFT.

Reaktywne formy tlenu powstałe w wyniku działania nanosrebra mogą prowadzić do zatrzymania podziału i śmierci komórek poprzez peroksydację lipidów błon komórkowych, aktywację kaskady kaspaz, zaburzenie autofagocytozy oraz uszkodzenie DNA i RNA.

Nanocząstki srebra mogą reagować również ze składowymi układu immunologicznego powodując jego pobudzenie lub inhibicję. Wiele badań wskazuje na stymulujący wpływ nanocząstek srebra na aktywność komórek fagocytarnych - makrofagów, komórek dendrytycznych oraz fagocytów krwi obwodowej. Komórki te łatwo pochłaniają nanocząstki, co w konsekwencji może prowadzić do ich pobudzenia i ekspresji cytokin prozapalnych takich jak: TNF – alfa, IL-1, czy IL-6. Liczni autorzy wskazują również na przeciwzapalne działanie nanosrebra, przejawiające się spadkiem poziomu prozapalnych cytokin oraz wskaźników stresu oksydacyjnego.

Mimo faktu, iż w ostatnim czasie przeprowadzono sporo doświadczeń mających na celu ocenę wpływu stosowania nanocząstek srebra na wyniki wzrostowe, metabolizm oraz odporność kurczą wiedza odnośnie tego zagadnienia jest wciąż niewystarczająca. Generalnie, istnieje wiele sprzecznych informacji na temat oddziaływania nanocząsteczek metalicznych, w tym nanosrebra na procesy odpornościowe i antyoksydacyjne. Podczas gdy niektórzy autorzy, obserwowali szkodliwe efekty w postaci stanów zapalnych lub immunotoksyczności, inni wskazują na właściwości przeciwzapalne, immunostymulujące i antyoksydacyjne nanosrebra.

Zakłada się, że wielkość kumulacji, a także spektrum działania nanocząstek srebra na status immunologiczny i antyoksydacyjny może być dość szerokie (od stymulacji po supresję), uzależnione od dawki, wielkości cząstek, nośnika, drogi, czasu i częstotliwości podawania, a także metody ich wytwarzania.

2. HIPOTEZY BADAWCZE

1. Istnieją takie dawki nanocząstek srebra (Ag-NPs), które poprawiają obronę antyoksydacyjną i immunologiczną kurcząt nie pogarszając przy tym wyników wzrostowych oraz zdrowotnych.
2. Wielkość Ag-NPs w hydrokoloidzie oraz dawka Ag-NPs aplikowana *per os* kurczętom ma wpływ na kumulację Ag w tkankach oraz odpowiedź immunologiczną i antyoksydacyjną organizmu.

3. CEL PRACY

Celem pracy było ustalenie, które dawki Ag-NPs (o wielkości 5 nm), spożyte przez kurczęta w efekcie różnego okresu aplikowania hydrokoloidów o stężeniu 5 lub 10 mg/L poprawiają obronę antyoksydacyjną i immunologiczną nie kumulując się przy tym i nie indukując procesów oksydacyjnych w tkankach.

Kolejnym aspektem pracy było określenie, w jaki sposób zwiększenie wielkości nanocząstek srebra z 5 do 25 lub 40 nm w hydrokoloidzie, które aplikowano kurczętom w dawce 2,87 lub 12,25 mg/szt. wpłynie na kumulację tego pierwiastka w tkankach oraz na odpowiedź immunologiczną i antyoksydacyjną organizmu.

4. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

4.1. Nanocząstki srebra

Do badań wykorzystano wodny roztwór nanocząstek srebra o stężeniu 50 mg/L, z którego przygotowano roztwory o stężeniach 5 i 10 mg/L. Były to niejonowe, nanokrystaliczne, chemicznie czyste cząsteczki o wielkości 5, 25 i 40 nm produkowane unikalną opatentowaną technologią w procesie fizycznym (niewybuchową, wysokoprądową metodą rozpadu metali) przez Nano Technologies Group, Inc. (USA). Wszystkie informacje na temat tego produktu są zawarte w europejskim opisie patentowym (EP 2 081 672 B1).

4.2. Materiał badawczy

Materiał doświadczalny stanowiło łącznie 576 seksowanych (♂) jednodniowych kurcząt linii Ross 308. Doświadczenia przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Badań na Zwierzętach w Lublinie (zgoda nr. 30/2014).

4.3. Metody badawcze

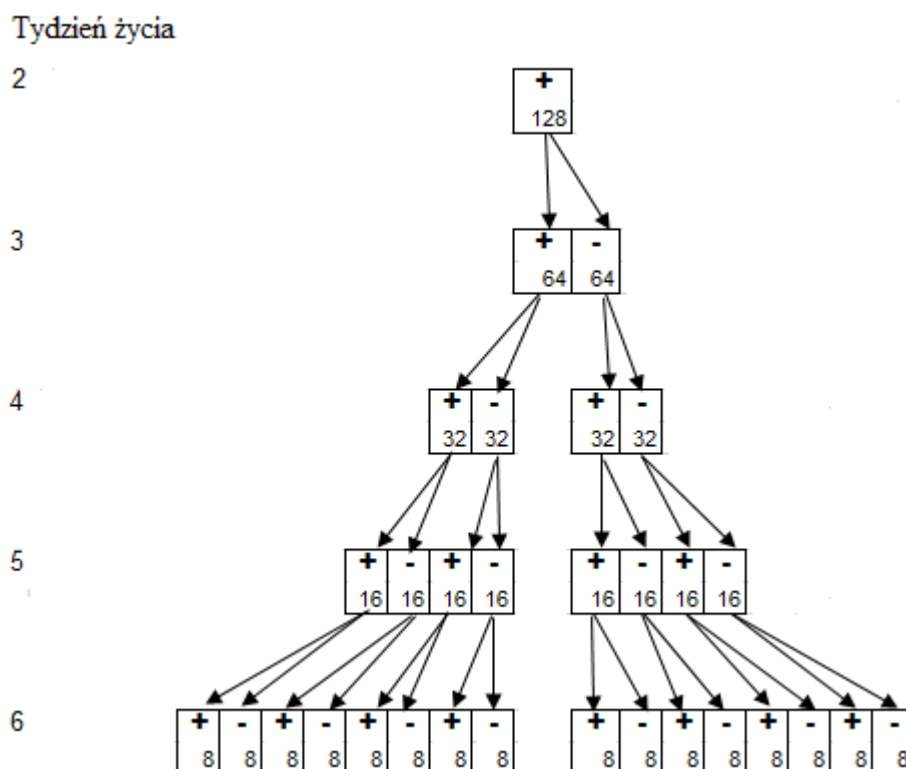
W ramach realizacji zaplanowanych badań przeprowadzono 2 doświadczenia w warunkach *in vivo* na kurczętach rzeźnych. Odchów ptaków prowadzony był w standardowych warunkach zoohigienicznych, w pomieszczeniu o regulowanej temperaturze i wilgotności. Kurczęta wszystkich grup doświadczalnych miały zapewniony stały dostęp do wody pitnej oraz

otrzymywały *ad libitum* mieszanki pełnoporcjowe odpowiednie do okresu odchowu. Wartość pokarmowa mieszanek była zbliżona do stosowanych w praktycznym żywieniu brojlerów w Polsce. Wartość pokarmową diety bazowej obliczono zgodnie z Polskimi Normami Żywienia Drobiu (Smulikowska i Rutkowski 2005).

Doświadczenie 1 (Kulak i in., 2018a; Kulak i in., 2018b)

Doświadczenie 1, przeprowadzono na 296 (128 x 2 + 40) sztukach, w którym jednodniowe kurczęta przydzielono do 3 grup doświadczalnych:

- Grupa kontrolna (C) - otrzymywała wodę pitną bez dodatku nanocząstek srebra.
- Grupa T-5 – otrzymywała hydrokoloid Ag-NPs o stężeniu 5 mg/L, zgodnie ze schematem 1.
- Grupa T-10 – otrzymywała hydrokoloid Ag-NPs o stężeniu 10 mg/L, zgodnie ze schematem 1.



Schemat 1. Sposób ustalania optymalnej dawki aplikowania nanocząsteczek srebra.

(+) - aplikowanie przez 7 dni hydrokoloidu nanocząstek srebra

(-) - brak aplikowania hydrokoloidu nanocząstek srebra

Doświadczenie 2 (Kulak i in., 2018c)

Na podstawie wyników uzyskanych w doświadczeniu 1 (Kulak i in., 2018a; Kulak i in., 2018b) dokonano wyboru dawek testowanych w doświadczeniu 2. Doświadczenie 2 przeprowadzono na 280 sztukach, w którym jednodniowe kurczęta przydzielono do 7 grup doświadczalnych:

- Grupa kontrolna (C) - otrzymywała wodę pitną bez dodatku nanocząstek srebra.
- Grupa S-5_(D1) - otrzymywała nanocząstki srebra o rozmiarze 5 nm w dawce 2,87 mg/szt.

- Grupa S-5_(D2) - otrzymywała nanocząstki srebra o rozmiarze 5 nm w dawce 12,25 mg/szt.
- Grupa S-25_(D1) - otrzymywała nanocząstki srebra o rozmiarze 25 nm w dawce 2,87 mg/szt.
- Grupa S-25_(D2) - otrzymywała nanocząstki srebra o rozmiarze 25 nm w dawce 12,25 mg/szt.
- Grupa S-40_(D1) - otrzymywała nanocząstki srebra o rozmiarze 40 nm w dawce 2,87 mg/szt.
- Grupa S-40_(D2) - otrzymywała nanocząstki srebra o rozmiarze 40 nm w dawce 12,25 mg/szt.

4.4. Procedury doświadczalne

W doświadczeniu 1 i 2 kurczęta ważono podczas wstawienia do doświadczenia oraz w 42 dniu życia. W czasie całego okresu tuczu kontrolowano spożycie paszy oraz śmiertelność.

W doświadczeniu 1, w 42 dniu życia kurcząt od 8 ptaków z każdej grupy pobrano krew do analiz wskaźników biochemicznych, statusu oksydoredukcyjnego oraz immunologicznego. W 42 dniu życia kurczęta uśmiercono, a następnie poprano próbki jelita cienkiego, wątroby, mięśnia piersiowego do oceny biodystrybucji srebra oraz statusu oksydoredukcyjnego. Pobrano również narządy limfatyczne, to jest śledzionę, grasicę i bursę Fabrycjusza do obliczenia indeksu organosomatycznego.

W doświadczeniu 2, w 42 dniu życia kurcząt od 8 ptaków z każdej grupy pobrano krew do analiz wskaźników statusu oksydoredukcyjnego oraz immunologicznego. W 42 dniu życia kurczęta uśmiercono, a następnie poprano próbki jelita cienkiego, wątroby, mięśnia piersiowego i serca do oceny biodystrybucji srebra. Próbkę jelita cienkiego poddano również ocenie histologicznej, natomiast w próbkach mięśnia piersiowego oznaczono wskaźniki statusu oksydoredukcyjnego.

4.5. Metodyka analityczna

Biodystrybucja

Zawartość srebra w próbkach wątroby, serca, jelita i mięśnia piersiowego oznaczono za pomocą spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie sprężonej indukcyjnie (ICP-OES).

Status oksydoredukcyjny

Zgodnie z metodyką opisana w Ognik i Wertelecki (2012) oznaczono zawartość nadtlenków lipidowych (LOOH), dialdehydu malonowego (MDA), zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) glutationu oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), katalazy (CAT) jako wskaźników obrazujących status oksydoredukcyjny we krwi, ścianie jelita cienkiego, wątrobie, mięśniu piersiowym kurcząt.

Status immunologiczny

Ilość leukocytów (WBC) we krwi oznaczono za pomocą analizatora hematologicznego Abacus Junior Vet. Szybkość sedymentacji erytrocytów (ESR) we krwi oznaczono metodą Wintrobe opisaną przez Bomskiego (1995). Aktywność ceruloplazminy oznaczono metodą kolorymetryczną (Sunderman i Nomoto 1970). Aktywność fagocytarną leukocytów wyrażoną jako % komórek fagocytujących (%PC) oraz indeks fagocytarny (PI) oznaczono metodą opisaną przez Siwicki i in. (1994). Wykonano również test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez heterofile (test NBT) (Park i in., 1968). Metody immunoenzymatyczne z wykorzystaniem czytnika płytek ELISA użyto do oznaczenia zawartości immunoglobulin IgA, IgY oraz interleukiny IL-6. Aktywność lizozymu oznaczono metodą turbidimetryczną (Siwicki i Anderson, 1993).

Badanie histologiczne jelit

Pobrane fragmenty jelit przecięto wzdłuż a następnie utrwalono przez 24h w 5% formalinie o pH = 7,2. Po utrwaleniu fragmenty tkankowe przeprowadzono w ciągu 24 godzin do bloczków parafinowych w procesorze tkankowym (Leica TP-20). Wykonane techniką parafinową preparaty mikroskopowe o grubości 5 μ m barwiono hematoksyliną i eozyną (barwienie HE). Do badań morfometrycznych długości kosmków jelitowych oraz głębokości krypt jelitowych wykorzystano system komputerowo wspomaganą analizę obrazu mikroskopowego. W każdym preparacie jelita mierzono 20 wzdłużnie przeciętych kosmków oraz 20 krypt jelitowych. Długość kosmków mierzono od ich wierzchołka do podstawy kosmka.

4.6. Analiza statystyczna

Zebrany materiał liczbowy opracowano statystycznie za pomocą jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA przy użyciu programu statystycznego STATISTICA 8.0PL (Statistica 8.0 software, StatSoft Inc., 2008). Szczegółowy opis modeli statystycznych przedstawiono w publikacjach Kulak i in. (2018a), Kulak i in. (2018b) i Kulak i in. (2018c).

5. WYNIKI

5.1. Wyniki wzrostowe kurcząt otrzymujących hydrokolid nanocząstek srebra

W doświadczeniu 1 (Kulak i in., 2018a) stwierdzono, iż pogorszenie wyników wzrostowych kurcząt nastąpiło dopiero podczas przyjęcia całkowitej dawki Ag-NPs w ilości 63.74 mg/szt (TAB. 1).

W doświadczeniu 2 (Kulak i in., 2018c) stwierdzono, iż niezależnie od zastosowanego dawkowania oraz wielkości cząstek, aplikowanie Ag-NPs nie spowodowało pogorszenia

wyników wzrostowych kurcząt (masy ciała 42-dniowych kurcząt były wyrównane), a przeżywalność kurcząt podczas doświadczenia wynosiła 100% (TAB. 2).

5.2. Ocena biodystrybucji srebra w tkankach kurcząt

Wyniki oceny biodystrybucji Ag w narządach kurcząt w doświadczeniu 1 (Kulak i in., 2018a) wskazują, że przyjęcie przez kurczęta Ag-NPs (5nm) w dawkach od 2,87 do 63,74 mg/szt. nie powodowało kumulacji Ag w mięśni piersiowym (TAB. 3). Jednak przyjęcie nawet najniższej dawki 2,87 mg/szt. przyczyniło się do kumulacji tego pierwiastka w ścianie jelita cienkiego i wątrobie kurcząt, a kolejne zwiększanie dawkowania relatywnie zwiększało kumulację Ag w tych tkankach.

Analizując wyniki biodystrybucji Ag w narządach kurcząt w doświadczeniu 2 (Kulak i in., 2018c) stwierdzono, że spożycie przez kurczęta każdej wielkości (5, 25 lub 40 nm) Ag-NPs w dawce 2,87 mg/szt. lub 12,25 mg/szt. nie spowodowało kumulacji tego pierwiastka w sercu oraz w mięśni piersiowym kurcząt (TAB. 4). Spowodowało natomiast kumulację Ag w jelicie i wątrobie, która wzrastała wraz ze zwiększaniem dawki. Nanocząstki srebra o większych rozmiarach bardziej niż te o mniejszych rozmiarach kumulowały się ścianach jelita cienkiego.

5.3. Status oksydoredukcyjny kurcząt otrzymujących hydrokolid nanocząstek srebra

W doświadczeniu 1 (Kulak i in., 2018a) stwierdzono, że niezależnie od zastosowanego stężenia 5 lub 10 mg/L zwiększanie dawki Ag-NPs, które było wynikiem wydłużania czasu aplikacji nanosrebra skutkowało zwiększeniem zawartości LOOH i MDA oraz aktywności SOD, GPx i CAT, a obniżeniem zawartości GSH we krwi kurcząt (TAB. 5). W przypadku podawania większego stężenia Ag-NPs (10 mg/L) stwierdzono wyższą zawartość LOOH i MDA oraz wyższą aktywność SOD we krwi kurcząt niż w przypadku aplikowania przez identyczny okres czasu Ag-NPs o stężeniu 5 mg/L. Pod wpływem zwiększania dawkowania Ag-NPs stwierdzono również: zwiększanie zawartości MDA w ścianie jelita cienkiego oraz mięśni piersiowym, zwiększenie zawartości LOOH w wątrobie oraz aktywności SOD i CAT w ścianach jelita cienkiego, a obniżanie w wątrobie i mięśni piersiowym. W ścianie jelita cienkiego, wątrobie oraz mięśni piersiowym kurcząt otrzymujących Ag-NPs o stężeniu 10 mg/L stwierdzono także wyższą zawartość MDA oraz GSSG niż u kurcząt otrzymujących przez identyczny okres czasu Ag-NPs o stężeniu 5 mg/L.

W doświadczeniu 2 (Kulak i in., 2018c) stwierdzono, iż niezależnie od zastosowanej dawki (2,87 mg/szt. lub 12,25) oraz wielkości Ag-NPs (5, 25, 40 nm) aplikowanie nanocząstek srebra kurczętom powodowało wzrost zawartości LOOH i MDA w osoczu krwi (TAB. 6). Jednak zwiększanie dawki Ag-NPs nasilało reakcje oksydacji w organizmie kurcząt. Wskazują na to wyniki badań, podczas których stwierdzono, że w osoczu krwi kurcząt, które otrzymały Ag-NPs

w dawce 12,25 mg/szt. zawartość GSH była mniejsza, a GSSG większa niż w osoczu krwi kurcząt, które otrzymały niższą dawkę Ag-NPs. Ponadto w mięśni piersiowym tych kurcząt stwierdzono wyższą aktywność SOD (TAB.7). Spośród trzech wielkości Ag-NPs (5, 25 i 40 nm), które aplikowano kurczętom w hydrokoloidzie, cząstki o wielkości 25 nm w najmniejszym stopniu indukowały reakcje oksydacyjne. Na fakt ten wskazują wyniki, w których stwierdzono, że we krwi tych kurcząt zawartość MDA w mięśni piersiowym była najniższa, zawartość GSH w osoczu krwi była najwyższa zaś aktywność GPx w erytrocytach najniższa.

Generalnie, zwiększenie wielkości cząstek miało znacznie mniejszy wpływ na nasilenie oksydacji lipidów niż zastosowana dawka. Większa dawka Ag-NPs (12,25 mg/szt.) bardziej niż mniejsza (2,87 mg/szt.) indukowała reakcje oksydacyjne w organizmie kurcząt.

5.4. Status immunologiczny kurcząt otrzymujących hydrokoloid nanocząstek srebra

Wyniki badań statusu immunologicznego kurcząt w doświadczeniu 1 (Kulak i in., 2018b), wykazały, że aplikowanie Ag-NPs o stężeniu 5 mg/L lub 10 mg/L w zakresie dawek: 2,87 – 12,25 mg/szt. wywołało efekt stymulujący układ immunologiczny wyrażający się wzrostem wybuchu tlenowego heterofilów oraz zwiększeniem koncentracji lizozymu (TAB. 8). Wyższe dawki Ag-NPs stymulowały również limfocyty B do produkcji immunoglobulin klasy IgA oraz IgY. Na ich efekt prozapalny świadczył wzrost poziomu IL-6, ceruloplazminy a także ESR (TAB. 9). Wydłużanie czasu aplikowania Ag-NPs, zarówno o stężeniu 5 mg/L i 10 mg/L zmniejszało masy narządów limfatycznych (TAB. 10).

W doświadczeniu 2 (Kulak i in., 2018c) stwierdzono, że aplikowanie kurczętom hydrokoloidu Ag-NPs o wielkości 5 nm, zarówno w dawce 2,87 mg/szt. jak i 12,25 mg/szt. nie indukowało reakcji zapalnych, a nawet obniżało aktywność Cp w osoczu krwi, (TAB. 11). Natomiast aplikowanie tych samych dawek Ag-NPs, jednak o większych rozmiarach Ag: 25 nm i 40 nm relatywnie wraz ze zwiększaniem rozmiaru Ag w hydrokoloidzie, powodowało zwiększenie wartości ESR, nasilało zatem reakcje zapalne, na co wskazywał także wzrost aktywności Cp. Analizując wpływ hydrokoloidu srebra na wskaźniki immunologiczne krwi stwierdzono, że niezależnie od zastosowanej wielkości Ag-NPs, aplikowanie większej dawki - 12,25 mg/szt. zwiększało ilość komórek redukujących NBT we krwi kurcząt. Z kolei zwiększanie wielkości nanocząstek srebra w hydrokoloidzie, relatywnie zmniejszało aktywność lizozymu we krwi (TAB. 12).

5.5. Ocena histologiczna jelita cienkiego kurcząt otrzymujących hydrokoloid nanocząstek srebra

Wyniki badań histologicznych jelita cienkiego kurcząt z doświadczenia 2 (Kulak i in., 2018c) wykazały, że aplikacja hydrokoloidu Ag-NPs o wielkości 5 nm w dawce 2,87 mg/szt.

przyczyniła się do zwiększenia długości kosmków w jelicie cienkim (TAB. 13). Natomiast niezależnie od zastosowanej dawki (2,87 mg/szt. lub 12,25 mg/szt.), większe wielkości Ag-NPs tj. 25 nm i 40 nm w hydrokoloidzie powodowały relatywne zmniejszanie długości kosmków, a zwiększanie głębokości krypt w jelicie cienkim. Zmniejszenie długości kosmków mogło być wynikiem większej kumulacji AgNPs o większych rozmiarach.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Srebro w formie nanocząstek podawane w dawkach od 2,87 do 63,74 mg/szt. nie kumuluje się w mięśniu piersiowym, natomiast już przy najmniejszych dawkach jest deponowane zarówno w jelicie cienkim jak i w wątrobie kurcząt. Nanocząstki srebra o większych rozmiarach (25 i 40 nm) bardziej niż te o mniejszych rozmiarach (5nm) kumulują się w ścianach jelita cienkiego.

Podawanie kurczętom hydrokoloidu nanocząstek srebra w zakresie dawek: 2,87 – 12,25 mg/szt. stymuluje układ immunologiczny, natomiast wyższe dawki Ag-NPs wykazują działanie prozapalnie. Zwiększenie wielkości nanocząstek Ag w hydrokoloidzie z 5 nm do 25 i 40 nm, niezależnie od zastosowanej dawki powoduje nasilenie reakcji zapalnych w organizmie.

Stosowanie nanocząstek srebra w dawkach większych niż 9,47 mg/szt. indukuje reakcje oksydacyjne we krwi, ścianie jelita cienkiego, wątrobie i mięśniu piersiowym kurcząt. Limity bezpieczeństwa wyznaczone dla nanocząstek srebra w okresie hodowli (42 dni), wyrażone jako NOAEL, w odniesieniu do skutków stresu oksydacyjnego wynoszą 9,47 mg/szt. (4,12 mg/kg masy ciała; dla m.c. = 2,30 kg), podczas gdy w odniesieniu do kumulacji Ag w mięśniu piersiowym wynoszą 63,74 mg/szt. (27,71 mg/kg masy ciała; dla m.c. = 2,30 kg).

TABELA 1. Masa ciała kurcząt (42 dzień życia), (doświadczenie 1)

Grupy		Ilość kurcząt	Masa ciała (kg)	
Wpływ dodatku (Ag-NPs)	Kontrola	n=40	2.24	
	Ag-NPs	n=256	2.25	
<i>P value</i>			0.78	
Wpływ stężenia (C)	5	n=128	2.25	
	10	n=128	2.24	
Wpływ czasu (T)	1×7 (2)	n=16	2.25 ^{ab}	
	2×7 (2,3)	(2,3)	n=16	2.20 ^b
		(2,4)	n=16	2.30 ^a
		(2,5)	n=16	2.29 ^a
		(2,6)	n=16	2.28 ^{ab}
	3×7 (2,3,4)	(2,3,4)	n=16	2.25 ^{abc}
		(2,3,5)	n=16	2.26 ^{ab}
		(2,3,6)	n=16	2.25 ^{abc}
		(2,4,5)	n=16	2.23 ^{abc}
		(2,4,6)	n=16	2.23 ^{abc}
	4×7 (2,3,4,5)	(2,3,4,5)	n=16	2.29 ^a
		(2,3,4,6)	n=16	2.27 ^{ab}
		(2,3,5,6)	n=16	2.26 ^{ab}
		(2,3,5,6)	n=16	2.27 ^{ab}
		(2,4,5,6)	n=16	2.21 ^b
5×7 (2,3,4,5,6)	n=16	2.16 ^c		
<i>P value</i>				
Wpływ stężenia (C)			0.462	
Wpływ czasu (T)			0.044	
Interakcja C x T			0.301	

^{a-c} Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$

TABELA 2. Masa ciała kurcząt (42 dzień życia), (doświadczenie 2)

Grupy	Masa ciała, kg/szt.	Zużycie paszy, kg/kg	
	1-42 dzień	1-42 dzień	
Kontrola (n = 8)	2.260	1.69	
Ag-NPs (n = 8)			
S-5 _(D1)	2.250	1.68	
S-5 _(D2)	2.245	1.68	
S-25 _(D1)	2.265	1.70	
S-25 _(D2)	2.248	1.71	
S-40 _(D1)	2.250	1.69	
S-40 _(D2)	2.265	1.70	
SEM	0.043	0.012	
Wpływ wielkości (S)	S-5	2.247	1.68
	S-25	2.256	1.70
	S-40	2.257	1.69
Wpływ dawki (D)	D1	2.255	1.69
	D2	2.252	1.68
<i>P-value</i>			
Kontrola vs. pozostałe grupy	0.158	0.695	
Wpływ wielkości (S)	0.263	0.963	
Wpływ dawki (D)	0.642	0.884	
Interakcja S × D	0.084	0.692	

SEM = błąd standardowy średniej

TABELA 3. Zawartość Ag w jelitach, wątrobie, sercu i mięśniach piersiowych kurcząt (doświadczenie 1)

Grupy		Zawartość Ag (ng/g)					
		Ściana jelita cienkiego	Wątroba	Serce	Mięśnie piersiowe		
Wpływ dodatku (AgNPs)	Kontrola	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
	Ag-NPs	3.85	1.86	0.027	<LOQ		
	<i>P value</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-		
Wpływ stężenia (C)	5	3.22	0.88	0.02	<LOQ		
	10	4.47	2.88	0.03	<LOQ		
Wpływ czasu (T)	1×7	(2)	0.77 ^h	0.66 ^g	<LOQ	<LOQ	
		2×7	(2,3)	1.46 ^g	0.71 ^g	<LOQ	<LOQ
			(2,4)	1.87 ^g	0.92 ^f	<LOQ	<LOQ
	3×7	(2,5)	2.06 ^f	0.99 ^f	<LOQ	<LOQ	
		(2,6)	1.74 ^g	1.38 ^e	<LOQ	<LOQ	
		(2,3,4)	3.05 ^e	1.52 ^e	<LOQ	<LOQ	
		(2,3,5)	3.57 ^{de}	1.70 ^d	<LOQ	<LOQ	
		(2,3,6)	3.69 ^{de}	2.18 ^c	<LOQ	<LOQ	
		(2,4,5)	3.03 ^e	1.88 ^d	<LOQ	<LOQ	
	4×7	(2,4,6)	4.82 ^d	2.32 ^{bc}	<LOQ	<LOQ	
		(2,5,6)	3.78 ^{de}	2.53 ^b	<LOQ	<LOQ	
		(2,3,4,5)	6.33 ^b	2.52 ^b	0.04	<LOQ	
		(2,3,4,6)	5.96 ^c	2.35 ^{bc}	0.04	<LOQ	
		(2,3,5,6)	5.65 ^c	2.74 ^a	0.11	<LOQ	
		(2,4,5,6)	6.08 ^{bc}	2.46 ^{bc}	0.106	<LOQ	
5×7	(2,3,4,5,6)	7.70 ^a	2.91 ^a	0.12	<LOQ		
P value:							
Wpływ stężenia (C)		<0.0001	<0.0001	0.263	-		
Wpływ czasu (T)		<0.0001	<0.0001	<0.0001	-		
Interakcja C x T		<0.0001	<0.0001	<0.0001	-		

^{a,b...} Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$, LOQ - granica oznaczalności (<LOQ=0.001)

TABELA 4. Zawartość Ag w jelitach, wątrobie, sercu i mięśniach piersiowych kurcząt (doświadczenie 2)

Grupy	Zawartość srebra (ng/g)			
	Jelito cienkie	Wątroba	Serce	Mięsień piersiowy
Kontrola (K) (n = 8)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ag-NPs (n = 8)				
S-5 _(D1)	0.340 ^{e*}	0.375 ^{b*}	<LOQ	<LOQ
S-5 _(D2)	0.898 ^{b*}	0.482 ^{a*}	0.02	<LOQ
S-25 _(D1)	0.426 ^{d*}	0.168 ^{d*}	<LOQ	<LOQ
S-25 _(D2)	1.030 ^{ab*}	0.232 ^{c*}	<LOQ	<LOQ
S-40 _(D1)	0.595 ^{c*}	0.105 ^{e*}	<LOQ	<LOQ
S-40 _(D2)	1.230 ^{a*}	0.158 ^{d*}	<LOQ	<LOQ
SEM	0.033	0.012	-	-
Wpływ wielkości (S)				
S-5	0.619	0.428	-	-
S-25	0.728	0.200	-	-
S-40	0.912	0.131	-	-
Wpływ dawki (D)				
D1	0.453	0.216	-	-
D2	1.052	0.290	-	-
P-value				
K vs. pozostałe grupy	<0.001	<0.001		
Wpływ wielkości (S)	0.014	0.001	-	-
Wpływ dawki (D)	0.002	0.016	-	-
Interakcja S x D	0.036	0.042	-	-

*Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0,05$ zgodnie z Testem t-Studenta. Dane z grup, którym aplikowano Ag-NPs, poddano dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA. ^{a,b}Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie ($P \leq 0,05$) według testu Newmana-Keulsa (tylko w przypadku istotnej interakcji S x D), SEM = błąd standardowy średniej, LOQ - granica oznaczalności (<LOQ=0.001)

TABELA 5. Wskaźniki układu oksydoredukcyjnego krwi kurcząt (doświadczenie 1)

Grupy		LOOH ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	MDA ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	GSH ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	GSSG ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	GSH/GSSG	SOD (U/g Hb)	GPx (U/g Hb)	CAT (U/g Hb)	
Wpływ dodatku (Ag-NPs)	Kontrola (K)	8.633	1.009	0.389	0.042	9.272	127.2	97.34	536.1	
	Ag-NPs	10.97	0.944	0.363	0.048	7.513	144.2	118.4	635.9	
<i>P value</i>		<0.0001	0.255	0.150	0.855	<0.0001	0.003	0.024	<0.0001	
Wpływ stężenia (C)	5	10.62	0.900	0.368	0.048	7.692	138.0 ^b	116.3	625.9	
	10	11.33	0.989	0.359	0.049	7.333	150.5 ^a	120.5	646.0	
Wpływ czasu (T)	1×7 (2)	9.210 ^d	0.824 ^c	0.415 ^a	0.044	9.341 ^a	131.0 ^d	111.2 ^c	511.2 ^c	
	2×7 (2,3)	(2,3)	9.510 ^d	0.812 ^c	0.372 ^b	0.044	8.419 ^b	125.1 ^e	98.00 ^c	507.7 ^d
		(2,4)	9.300 ^d	0.984 ^b	0.377 ^b	0.046	8.092 ^b	136.3 ^d	109.0 ^c	504.7 ^c
		(2,5)	9.520 ^d	0.958 ^b	0.335 ^b	0.047	7.135 ^c	126.3 ^e	117.3 ^{bc}	485.8 ^d
	3×7 (2,3,4)	(2,6)	9.660 ^d	0.808 ^c	0.365 ^b	0.045	8.075 ^b	129.0 ^e	116.2 ^{bc}	566.7 ^c
		(2,3,4)	10.37 ^c	0.926 ^b	0.355 ^b	0.048	7.403 ^c	133.7 ^d	118.0 ^{bc}	582.9 ^c
		(2,3,5)	9.680 ^d	0.915 ^b	0.375 ^b	0.050	7.427 ^c	135.8 ^d	113.9 ^{bc}	620.1 ^{bc}
	(2,3,6)	(2,3,6)	12.07 ^b	0.859 ^c	0.362 ^b	0.052	6.975 ^d	155.8 ^b	112.3 ^{bc}	670.7 ^{bc}
		(2,4,5)	12.83 ^b	0.886 ^c	0.371 ^b	0.050	7.360 ^c	145.8 ^c	127.2 ^b	621.5 ^{bc}
		(2,4,6)	11.75 ^{bc}	0.864 ^c	0.373 ^b	0.047	7.819 ^c	158.4 ^b	122.8 ^b	671.7 ^{bc}
	4×7 (2,3,4,5)	(2,5,6)	10.10 ^c	0.884 ^c	0.368 ^b	0.046	7.857 ^c	135.9 ^d	124.0 ^b	766.7 ^b
		(2,3,4,5)	10.71 ^c	1.147 ^a	0.330 ^b	0.050	6.609 ^c	133.4 ^d	125.0 ^b	697.5 ^{bc}
		(2,3,4,6)	12.62 ^b	1.100 ^a	0.339 ^b	0.051	6.593 ^c	154.6 ^b	122.4 ^b	758.0 ^b
	(2,3,5,6)	(2,3,5,6)	14.13 ^a	1.096 ^a	0.431 ^a	0.051	8.422 ^b	168.9 ^a	121.8 ^b	746.7 ^b
		(2,4,5,6)	11.46 ^{bc}	0.972 ^b	0.334 ^b	0.053	6.312 ^d	170.6 ^a	119.5 ^{bc}	648.4 ^c
5×7 (2,3,4,5,6)		12.60 ^b	0.889 ^c	0.315 ^c	0.050	6.363 ^d	166.1 ^a	135.9 ^a	815.0 ^a	
<i>P-value</i>										
Wpływ stężenia (C)		0.002	0.054	0.103	0.829	0.152	<0.0001	0.264	0.587	
Wpływ czasu (T)		0.001	0.006	0.044	0.354	0.033	0.014	0.021	<0.0001	
Interakcja CxT		0.034	0.164	<0.0001	0.647	0.261	0.366	0.059	<0.0001	

^{a-d} Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$ LOOH – nadtlenki lipidowe, MDA dialdehyd malonowy, GSH – zredukowany glutation, GSSG - utleniony glutation, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, GPx - peroksydaza glutationowa, CAT - katalaza

TABELA 6. Wskaźniki układu oksydoredukcyjnego krwi kurcząt (doświadczenie 2)

Grupy		LOOH ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	MDA ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	GSH ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	GSSG ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	SOD (U/g Hb)	GPx (U/g Hb)	CAT (U/g Hb)
Kontrola (K) (n = 8)		7.26	0.829	0.334	0.042	142.2	88.64	612.5
Ag-NPs (n = 8)								
S-5 _(D1)		8.54*	1.088*	0.396	0.045	138.6	95.36*	582.3
S-5 _(D2)		9.32*	1.106*	0.133*	0.053*	156.3*	106.2*	623.4
S-25 _(D1)		8.96*	1.046*	0.464*	0.041	148.4	84.67	588.6
S-25 _(D2)		8.67*	0.887	0.342	0.046	151.5	79.94	614.2
S-40 _(D1)		7.88	0.874	0.329	0.044	145.3	94.66	586.9
S-40 _(D2)		8.86*	0.976*	0.395	0.055*	143.1	111.3*	608.6
SEM		0.039	0.145	0.088	0.026	0.036	0.055	0.034
Wpływ wielkości (S)	S-5	8.93	1.097	0.264 ^b	0.049	147.4	100.7 ^a	602.8
	S-25	8.81	0.966	0.403 ^a	0.043	149.9	82.30 ^b	601.4
	S-40	8.37	0.925	0.362 ^{ab}	0.042	144.2	102.9 ^a	597.7
Wpływ dawki (D)	D1	8.46	1.002	0.396	0.043	144.1	91.56	585.9
	D2	8.95	0.989	0.290	0.051	150.3	99.14	615.4
<i>P</i> -value								
K vs. pozostałe grupy		0.033	0.005	0.027	0.052	0.042	0.014	0.061
Wpływ wielkości (S)		0.073	0.062	0.036	0.708	0.079	0.051	0.064
Wpływ dawki (D)		0.067	0.072	0.021	0.043	0.082	0.084	0.088
Interakcja S x D		0.512	0.641	0.368	0.114	0.266	0.098	0.154

*Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0,05$ zgodnie z Testem t-Studenta. Dane z grup, którym aplikowano Ag-NP, poddano dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA. ^{a,b}.....Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie ($P \leq 0,05$) według testu Newmana-Keulsa (tylko w przypadku istotnej interakcji S x D), SEM = błąd standardowy średniej, LOOH – nadtlenki lipidowe, MDA - dialdehyd malonowy, GSH – zredukowany glutation, GSSG - utleniony glutation, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, GPx - peroksydaza glutationowa, CAT - katalaza

TABELA 7. Wskaźniki układu oksydoredukcyjnego mięśnia piersiowego kurcząt (doświadczenie 2)

Grupy		LOOH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	GSSG ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (U/g protein)	CAT (U/g protein)
Kontrola (K) (n = 8)		2.856	0.496	4.265	0.233	5.236	12.85
Ag-NPs (n = 8)							
S-5 _(D1)		3.054*	0.533*	4.125	0.245	4.944	13.12
S-5 _(D2)		3.025*	0.506	4.165	0.264	5.136	12.77
S-25 _(D1)		2.941	0.388*	4.058*	0.255	5.106	11.89
S-25 _(D2)		2.861	0.482	4.235	0.208	5.078	12.35
S-40 _(D1)		2.749	0.514	4.095*	0.274	5.366	11.52
S-40 _(D2)		2.944	0.503	4.147	0.247	2.145*	12.39
SEM		0.207	0.049	0.095	0.007	0.167	0.103
Wpływ wielkości (S)	S-5	3.039	0.519 ^a	4.145	0.254	5.040 ^a	12.94
	S-25	2.901	0.435 ^b	4.146	0.231	5.090 ^a	12.12
	S-40	2.846	0.508 ^{ab}	4.121	0.260	3.755 ^b	11.95
Wpływ dawki(D)	D1	2.914	0.478	4.092	0.258	5.138	12.17
	D2	2.943	0.497	4.182	0.239	4.119	12.50
<i>P</i> -value							
K vs. pozostałe grupy		0.003	0.018	0.046	0.328	<0.001	0.109
Wpływ wielkości (S)		0.063	0.045	0.071	0.066	0.002	0.073
Wpływ dawki (D)		0.076	0.133	0.061	0.073	0.008	0.084
Interakcja S x D		0.067	0.079	0.464	0.309	0.166	0.095

*Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0,05$ zgodnie z Testem t-Studenta. Dane z grup, którym aplikowano Ag-NP, poddano dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA. ^{a,b}.....Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie ($P \leq 0,05$) według testu Newmana-Keulsa (tylko w przypadku istotnej interakcji $S \times D$), SEM = błąd standardowy średniej, LOOH – nadtlarki lipidowe, MDA - dialdehyd malonowy, GSH – zredukowany glutation, GSSG - utleniony glutation, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, CAT - katalaza

TABELA 8. Wskaźniki immunologiczne krwi (doświadczenie 1)

Grupy		IgA (ng ml ⁻¹)	IgY (ng ml ⁻¹)	%PC	PI	NBT	LIZOZYM (mg l ⁻¹)	
Wpływ dodatku (AgNPs)	Kontrola (K)	0.190	0.635	36.26	5.26	32.60	4.25	
	Ag-NPs	0.372	0.874	36.33	4.98	30.01	4.15	
<i>P</i> value		<0.000	0.001	0.682	0.079	0.071	0.063	
Wpływ stężenia (C)	5	0.344	0.797	36.71	5.01	30.37	4.21	
	10	0.400	0.951	35.94	4.95	29.66	4.11	
Wpływ czasu (T)	1×7	(2)	0.195 ^d	0.634 ^c	41.77	4.97	35.45 ^{ab}	6.15 ^a
	2×7	(2,3)	0.180 ^d	0.615 ^c	40.63	4.93	39.71 ^a	6.33 ^a
		(2,4)	0.180 ^d	0.596 ^d	35.57	4.62	36.12 ^a	5.78 ^a
		(2,5)	0.181 ^d	0.646 ^c	39.20	5.13	37.81 ^a	4.93 ^b
	3×7	(2,6)	0.190 ^d	0.665 ^c	37.31	4.79	38.35 ^a	5.77 ^a
		(2,3,4)	0.430 ^b	0.845 ^b	35.81	5.13	28.91 ^b	4.30 ^b
		(2,3,5)	0.410 ^b	0.747 ^{bc}	35.09	5.16	29.60 ^b	3.74 ^c
	4×7	(2,3,6)	0.320 ^b	0.884 ^b	35.25	5.11	30.82 ^b	3.96 ^c
		(2,4,5)	0.280 ^c	0.729 ^{bc}	34.59	5.14	28.86 ^b	3.79 ^c
		(2,4,6)	0.380 ^{bc}	0.852 ^b	34.50	5.07	26.17 ^c	3.15 ^c
	5×7	(2,5,6)	0.320 ^{bc}	1.311 ^a	36.73	5.04	26.31 ^c	4.34 ^b
		(2,3,4,5)	0.630 ^a	1.230 ^a	34.99	5.08	24.33 ^c	3.02 ^d
		(2,3,4,6)	0.610 ^a	1.340 ^a	35.73	4.73	24.90 ^c	2.90 ^d
	5×7	(2,3,5,6)	0.460 ^b	0.839 ^b	35.20	4.79	23.55 ^c	2.69 ^d
		(2,4,5,6)	0.500 ^{ab}	0.933 ^{ab}	34.12	4.79	25.16 ^c	2.76 ^d
5×7 (2,3,4,5,6)		0.660 ^a	1.240 ^a	34.79	5.21	25.82 ^c	2.86 ^d	
<i>P</i> value								
Wpływ stężenia (C)		0.032	0.003	0.223	0.066	0.351	0.664	
Wpływ czasu (T)		<0.000	0.037	0.071	0.284	0.004	0.001	
Interakcja C x T		0.063	0.081	0.092	0.588	0.082	0.124	

^{a-b}...Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0.05$, IgA – immunoglobulina A, IgY – immunoglobulina Y, %PC - % komórek fagocytujących, PI – indeks fagocytarny, NBT – test redukcji NBT przez heterofile

TABELA 9. Wskaźniki stanu zapalnego (doświadczenie 1)

Grupy		ESR (mm h ⁻¹)	WBC (10 ⁹ l ⁻¹)	Cp (U l ⁻¹)	IL-6 (pg ml ⁻¹)	
Wpływ dodatku (Ag-NPs)	Kontrola (K)	2.53	23.40	0.269	0.08	
	Ag-NPs	5.00	23.90	0.510	0.18	
<i>P</i> value		0.001	0.269	<0.0001	0.042	
Wpływ stężenia (C)	5	4.93	24.01	0.500	0.173 ^b	
	10	5.08	23.80	0.521	0.201 ^a	
Wpływ czasu (T)	1×7	(2)	2.52 ^d	22.85	0.264 ^d	0.085 ^d
		2×7	(2,3)	3.30 ^c	22.89	0.272 ^d
	(2,4)		2.29 ^d	23.95	0.299 ^d	0.060 ^d
	(2,5)		2.24 ^d	21.50	0.279 ^d	0.080 ^d
	3×7	(2,6)	2.28 ^d	23.70	0.245 ^d	0.090 ^c
		(2,3,4)	4.09 ^c	22.87	0.657 ^b	0.210 ^b
		(2,3,5)	4.15 ^c	22.81	0.586 ^b	0.220 ^b
		(2,3,6)	3.48 ^c	24.65	0.722 ^{ab}	0.210 ^b
	4×7	(2,4,5)	6.42 ^b	23.05	0.478 ^{bc}	0.090 ^c
		(2,4,6)	7.15 ^a	23.40	0.356 ^c	0.090 ^c
		(2,5,6)	3.15 ^c	22.74	0.312 ^c	0.104 ^c
		(2,3,4,5)	7.31 ^{ab}	24.65	0.684 ^b	0.320 ^a
		(2,3,4,6)	7.28 ^{ab}	24.00	0.786 ^{ab}	0.350 ^a
	5×7	(2,3,5,6)	7.31 ^{ab}	25.15	0.638 ^b	0.320 ^a
		(2,4,5,6)	7.04 ^{ab}	24.6	0.817 ^a	0.260 ^b
		(2,3,4,5,6)	9.28 ^a	25.26	0.803 ^a	0.370 ^a
	<i>P</i> value					
Wpływ stężenia (C)		0.628	0.167	0.547	0.024	
Wpływ czasu (T)		0.002	0.062	0.003	0.004	
Interakcja C x T		0.035	0.359	0.044	0.002	

^{a,b...}Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0.05$, ESR – odczyn opadania krwinek, WBC – leukocyty, Cp – ceruloplasmina, IL-6 – interleukina 6

TABELA 10. Indeks organów immunokompetentnych (doświadczenie 1)

Grupy		Indeks organo-somatyczny			
		Śledziona	Grasica	Bursa Fabrycjusza	
Wpływ dodatku (Ag-NPs)	Kontrola (K)	0.093	0.311	0.164 ^a	
	AgNPs	0.095	0.303	0.123 ^b	
	<i>P</i> value	0.723	0.584	<0.001	
Wpływ stężenia (C)	5	0.093	0.305	0.123	
	10	0.097	0.300	0.124	
Wpływ czasu (T)	1×7 (2)	0.094	0.318 ^a	0.135 ^a	
	2×7 (2,3)	(2,4)	0.097	0.296 ^b	0.128 ^{abc}
		(2,5)	0.092	0.310 ^{ab}	0.130 ^{ab}
		(2,6)	0.096	0.305 ^b	0.124 ^b
		(2,3,4)	0.106	0.304 ^b	0.124 ^b
	3×7 (2,3,5)	(2,3,4)	0.092	0.288 ^{bc}	0.125 ^b
		(2,3,5)	0.096	0.287 ^{bc}	0.127 ^b
		(2,3,6)	0.089	0.304 ^b	0.123 ^b
		(2,4,5)	0.095	0.320 ^a	0.125 ^{bc}
	4×7 (2,4,6)	(2,4,6)	0.090	0.315 ^a	0.122 ^b
		(2,5,6)	0.094	0.301 ^b	0.118 ^c
		(2,3,4,5)	0.089	0.285 ^{bc}	0.121 ^b
		(2,3,4,6)	0.100	0.300 ^b	0.118 ^c
	5×7 (2,3,5,6)	(2,3,5,6)	0.104	0.311 ^a	0.112 ^c
		(2,4,5,6)	0.098	0.299 ^b	0.121 ^b
(2,3,4,5,6)		0.089	0.279 ^c	0.118 ^c	
<i>P</i> value					
Wpływ stężenia (C)		0.114	0.345	0.621	
Wpływ czasu (T)		0.117	0.047	0.019	
Interakcja C × T		0.108	0.035	0.058	

^{a-b}...Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$

TABELA 11. Wskaźniki immunologiczne krwi (doświadczenie 2)

Grupy		IgA (ng ml ⁻¹)	IgY (ng ml ⁻¹)	%PC	PI	NBT	LIZOZYM (mg l ⁻¹)
Kontrola (K) (n = 8)		0.206	0.694	35.49	5.11	29.83	3.97
Ag-NPs (n = 8)							
	S-5 _(D1)	0.189	0.648	38.28	4.87	32.14 ^b	5.45 [*]
	S-5 _(D2)	0.194	0.709	34.46	5.06	36.42 ^{a*}	5.69 [*]
	S-25 _(D1)	0.201	0.719	39.14	4.88	30.61 ^b	5.28 [*]
	S-25 _(D2)	0.215	0.675	33.67	5.24	37.88 ^{a*}	4.09
	S-40 _(D1)	0.193	0.683	37.48	5.13	34.25 ^{ab}	4.17
	S-40 _(D2)	0.206	0.713	35.44	4.63	38.44 ^{a*}	4.86 [*]
SEM		0.057	0.091	0.008	0.012	0.064	0.043
Wpływ wielkości (S)	S-5	0.191	0.678	36.37	4.96	34.28	5.57 ^a
	S-25	0.208	0.697	36.40	5.06	34.24	4.68 ^b
	S-40	0.199	0.698	36.48	4.88	36.34	4.51 ^b
Wpływ dawki (D)	D1	0.194	0.683	38.30	4.96	32.33	4.96
	D2	0.205	0.699	34.52	4.97	37.58	4.88
<i>P</i> -value							
K vs. pozostałe grupy		0.092	0.354	0.609	0.824	0.042	0.022
Wpływ wielkości (S)		0.073	0.118	0.088	0.108	0.071	0.034
Wpływ dawki (D)		0.062	0.093	0.063	0.912	0.044	0.077
Interakcja S x D		0.074	0.071	0.236	0.064	0.012	0.109

*Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0,05$ zgodnie z Testem t-Studenta. Dane z grup, którym aplikowano Ag-NPs, poddano dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA. ^{a,b,...}Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie ($P \leq 0,05$) według testu Newman-Keulsa (tylko w przypadku istotnej interakcji S x D), SEM = błąd standardowy średniej, IgA – immunoglobulina A, IgY – immunoglobulina Y, %PC - % komórek fagocytujących, PI – indeks fagocytarny, NBT – test redukcji NBT przez heterofile

TABELA 12. Wskaźniki stanu zapalnego (doświadczenie 2)

Grupy		ESR (mm h ⁻¹)	WBC (10 ⁹ l ⁻¹)	Cp (U l ⁻¹)	IL-6 (pg ml ⁻¹)
Kontrola (K) (n = 8)		2.26	22.61	0.328	0.062
Ag-NPs (n = 8)					
	S-5 _(D1)	2.35	23.09	0.267*	0.075
	S-5 _(D2)	2.44	22.64	0.259*	0.064
	S-25 _(D1)	2.17	23.12	0.308	0.071
	S-25 _(D2)	2.37	24.26	0.331	0.058
	S-40 _(D1)	2.41	23.09	0.318	0.062
	S-40 _(D2)	3.11*	22.37	0.314	0.073
SEM		0.022	0.004	0.011	0.006
Wpływ wielkości (S)	S-5	2.39 ^b	22.70	0.263 ^b	0.069
	S-25	2.27 ^b	23.69	0.319 ^a	0.064
	S-40	2.76 ^a	22.72	0.316 ^a	0.067
Wpływ dawki (D)	D1	2.31	23.10	0.297	0.069
	D2	2.64	23.09	0.301	0.065
<i>P</i> -value					
K vs. pozostałe grupy		0.024	0.632	0.039	0.048
Wpływ wielkości (S)		0.051	0.264	0.042	0.074
Wpływ dawki (D)		0.254	0.842	0.082	0.126
Interakcja S x D		0.355	0.514	0.625	0.312

*Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0,05$ zgodnie z Testem t-Studenta. Dane z grup, którym aplikowano Ag-NPs, poddano dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA. ^{a,b...} Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie ($P \leq 0,05$) według testu Newman-Keulsa (tylko w przypadku istotnej interakcji S × D), SEM = błąd standardowy średniej, ESR – odczyn opadania krwinek, WBC – leukocyty, Cp – ceruloplasmina, IL-6 – interleukina 6

TABELA 13. Pomiary kosmków i krypt jelita czczego

Grupy		Kosmki jelita czczego (μm)	Krypty jelita czczego (μm)	Długość kosmków/ głębokość krypt
Kontrola (K) (n = 8)		2184.5	154.62	14.11
Ag-NPs (n = 8)				
	S-5 _(D1)	2231.5 ^{a*}	163.4 _b	13.65 [*]
	S-5 _(D2)	2036.9 ^{ab}	157.9 ^c	12.89 [*]
	S-25 _(D1)	1982.4 ^{ab}	184.2 ^{a*}	10.86 [*]
	S-25 _(D2)	1877.5 ^{b*}	176.4 ^{ab*}	10.64 [*]
	S-40 _(D1)	1945.6 ^{ab*}	184.6 ^{a*}	10.53 [*]
	S-40 _(D2)	1830.5 ^{b*}	168.2 ^{b*}	10.88 [*]
SEM		0.236	0.018	0.037
Wpływ wielkości (S)	S-5	2133.9 ^a	160.6 ^b	13.27 ^a
	S-25	1929.9 ^{ab}	180.3 ^a	10.75 ^b
	S-40	1888.0 ^b	176.4 ^{ab}	10.70 ^b
Dosage effect (D)	D1	2053.1	177.4	11.68
	D2	1914.9	167.5	11.47
<i>P</i> -value				
K vs. pozostałe grupy		0.006	0.012	0.021
Wpływ wielkości (S)		0.042	0.031	0.032
Wpływ dawki (D)		0.164	0.264	0.365
Interakcja S x D		0.224	0.342	0.745

*Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie od kontroli przy $P \leq 0,05$ zgodnie z Testem t-Studenta. Dane z grup, którym aplikowano Ag-NPs, poddano dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA. ^{a,b...} Wartości w tej samej kolumnie różnią się istotnie ($P \leq 0,05$) według testu Newman-Keulsa (tylko w przypadku istotnej interakcji S \times D), SEM = błąd standardowy średniej

