



Technologia *in ovo* – narzędziem w nowoczesnej profilaktyce drobiu

Marek Bednarczyk¹, Jadwiga Brzezińska¹, Anna Sławińska¹,
Maria Siwek¹, Mariusz Urbanowski², Katarzyna Kasperczyk¹

¹Katedra Biotechnologii Zwierząt,
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz
²Vet-Trade Polska Sp. z o.o., Lesznowola

In ovo technology – a tool of modern prophylactic in poultry

Summary

Bird (chick) embryonic development takes place within the egg – *in ovo*, outside its mother's body, making the embryo readily accessible to intervention, through the window which is cut in the eggshell. This fact was initially used for elaboration of *in ovo* embryo vaccination technology. Advances in animal biotechnology suggest several novel approaches that may be applied to *in ovo* technology, including for example: stimulation of beneficial bacterial profile in the colon of chicken, stimulation of immunological response, stimulation of embryonic development, teratogenic effects testing, selection for sexual phenotype, injection of genetically modified cells, etc. The use of feed additions such as prebiotics and probiotics or their combination- synbiotics influences health and chicken performance. Their administration *in ovo* could have an advantageous impact on an early development of immunological system in broiler chickens. In this overview, the new possibilities for practical use of the above-mentioned additions administrated by *in ovo* technology were presented.

Key words:

chicken, *in ovo* technology, prebiotic, probiotic, synbiotic, immunological system stimulation.

Adres do korespondencji

Marek Bednarczyk,
Katedra Biotechnologii
Zwierząt,
Uniwersytet
Technologiczno-
Przyrodniczy,
ul. Mzowiecka 28,
85-084 Bydgoszcz

1. Wprowadzenie

Poszczególne etapy rozrodu ptaków obejmują, podobnie jak u ssaków: oogenezę → dojrzewanie oocytu → owulację → zapłodnienie → rozwój zarodka → wyklucie (narodziny) nowego osobnika. Jednakże ich przebieg jest specyficzny. Oocyt ptaka

zawierający duże ilości żółtka owulowany jest w stadium metafazy I. podziału mejo-tycznego. Proces dojrzewania oocytu rozpoczyna się około 4 godz. przed owulacją i wizualnie przejawia się zanikiem błony jądrowej oocytu, wcześniej widoczne jest bardzo duże (około 0,35 mm średnicy) jądro. Owulacja oocytu następuje zwykle 10-30 min po zniesieniu poprzedniego jaja. W lejku jajowodu następuje zapłodnienie, które ma charakter polispermiczny, bowiem do cytoplazmy jaja wnika nawet kilkaset plemników, ale tylko jedno z wielu utworzonych przedjądrzy bierze udział w procesie syngamii i tworzeniu jądra zygoty. W ciągu następnych około 20-25 godz. komórka jajowa przesuując się przez jajowód zostaje otoczona białkiem oraz błonami w tym skorupową. W tym czasie następują też pierwsze podziały zarodka (1). U ptaków występuje bruzdkowanie częściowe, ograniczone do blastodysku, leżącego na dużej kuli niepodzielnego żółtka. Tarcza zarodkowa różnicuje się na dwie warstwy; powierzchnią (epiblast), złożoną z kilku pokładów komórek, stanowiących materiał na wszystkie listki zarodkowe oraz leżącą niżej pojedynczą warstwę (hipoblast) silnie spłaszczonych komórek endodermy. Epiblast i hipoblast ulegają rozszczepieniu tylko w części środkowej, natomiast w części obwodowej obie warstwy łączą się brzegami, które uniesione nieco nad żółtkiem umożliwiają powstanie pomiędzy zarodkiem a materiałem zapasowym tzw. jamy podzarodkowej (2).

W momencie zniesienia jaja zarodek osiąga stadium blastuli, liczące 50 000 – 60 000 komórek (3). W tej formie jego rozwój może ulec zahamowaniu, nawet od kilku do kilkunastu dni. Dalej przebiega poza organizmem matki *in ovo*, w temperaturze około 37,8°C i wilgotności względnej powietrza 60%.

Dzięki wspomnianym właściwościom zarodek kury stanowi klasyczny system umożliwiający szczegółową obserwację poszczególnych faz oraz procesów rozwojowych zwierząt kręgowych. Ponad dwudziestodniowy rozwój zarodka *in ovo*, na który czynniki mateczne nie mają bezpośredniego wpływu stanowi doskonały, łatwo dostępny, bardzo tani (zapłodnione jajo kosztuje około 60 groszy) model doświadczalny. Wiele prac do niedawna doświadczalnych znalazło w ostatnim dziesięcioleciu praktyczne zastosowanie, do tego stopnia, że możemy obecnie mówić o narodzinach nowej technologii – technologii *in ovo*.

2. Technologia *in ovo*

Technologia *in ovo*, polega na iniekcji różnorodnych substancji do komory powietrznej jaj lub bezpośrednio do rozwijającego się zarodka. Została opracowana w latach 90. XX w., w USA, początkowo jedynie w celu automatycznego szczepienia piskląt przeciwko chorobie Mareka (4) jak również łącznie przeciwko chorobie Mareka i chorobie Gumboro. Od tego czasu znalazła znacznie szersze zastosowanie, m.in. w celu: a) stymulacji korzystnego profilu bakterii wylężonych piskląt (5), b) stymulacji odpowiedzi immunologicznej (6), c) stymulacji rozwoju zarodków (7), d) testowania efektów teratogennych (8), e) określania płci zarodków (9), f) iniekcji ko-

mórek zmodyfikowanych genetycznie (cyt. za 6), itd. Zaletą automatycznej iniekcji, bezpośrednio do komory powietrznej jaja (zarodka) jest redukcja kosztów robocizny, precyzja wykonania zabiegu, eliminacja ubocznych efektów wpływających niekorzystnie na wylęgowość, możliwość oddziaływania na rozwój embrionalny – począwszy od jego wczesnej fazy (24 godz).

Dwa pierwsze z wymienionych zastosowań (a i b) są podstawą dalszej części tego opracowania.

3. Stymulacja korzystnego profilu bakterii wylężonych piskląt

Flora bakteryjna przewodu pokarmowego ptaków jest niezbędna, zarówno do właściwego funkcjonowania organizmu i prawidłowego przebiegu procesów trawiennych, jak również ma istotne znaczenie w kształtowaniu odporności organizmu na choroby. Bakterie znajdujące się w przewodzie pokarmowym piskląt są w ścisłym kontakcie z grudkami limfatycznymi układu immunologicznego. Interakcja pomiędzy tymi dwoma elementami: bakteriami i grudkami limfatycznymi, ma znaczący wpływ na modulację układu immunologicznego gospodarza.

Czynnikami modulującymi układ immunologiczny poprzez działanie w układzie pokarmowym są dodatki paszowe w postaci: prebiotyków, probiotyków i synbiotyków. Prebiotyki definiowane są najczęściej jako składniki paszy (pokarmu), które nie ulegają trawieniu w żołądku oraz jelicie zwierząt monogastrycznych. Z chemicznego punktu widzenia są to cukry złożone (polisacharydy). Wśród nich można wyróżnić: RFO – oligosacharydy z rodziny rafinozy, FOS – fruktooligosacharydy, MOS – monooligosacharydy, GOS – galaktooligosacharydy, IN – inulina, stachioza (5). Bogatym źródłem tych związków są korzenie, nasiona lub owoce roślin, np. cykorii, czosnku, cebuli, szparagów, słonecznika, soczewicy, łubinu, grochu, peluszkki, i in.

Probiotyki to żywe mikroorganizmy, najczęściej bakterie fermentacji mlekowej lub/oraz drożdże, które podawane w odpowiednich ilościach wywierają korzystne działanie w organizmie gospodarza. Najczęściej badane to: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp., i *Bacillus* sp. (10).

Termin synbiotyk odnosi się natomiast do połączenia prebiotyku z probiotykiem, które podawane razem wykazują działanie synergiczne w celu stymulacji rozwoju prawidłowej flory przewodu pokarmowego. W takim zestawieniu składnik prebiotyczny selektywnie promuje rozwój składnika probiotycznego, np. prebiotyk – oligofruktoza stymuluje namnażanie się w przewodzie pokarmowym bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.

Do tej pory stosunkowo dobrze poznano korzystne oddziaływanie probiotyków i prebiotyków na rozwój oraz funkcjonowanie organizmu (11). Publikacje dotyczące wykorzystania synbiotyków w żywieniu ptaków są nieliczne i ograniczają się do badania histomorfologii i masy organów wewnętrznych (12,13).

Prebiotyki oddziałują na organizm gospodarza w wyniku: zrównoważonego rozwoju korzystnej mikroflory jelitowej, hamowania infekcji powodowanej przez bakterie chorobotwórcze, ograniczania następstw związanych z działaniem toksyn produkowanych przez szkodliwe bakterie, stymulacji zdolności fagocytarnych komórek żernych, zwiększenia aktywności mechanizmów odporności humoralnej, redukcji ryzyka hipoglikemii, alergii czy chorób nowotworowych. Bifidobakterie, np. jako organizmy heterofermentacyjne, wytwarzają, podczas rozkładu cukrów, kwas mlekowy w formie L(+) i kwas octowy w stosunku 2:3, co wpływa na obniżenie pH treści jelita i drastycznie ogranicza rozwój bakterii patogennych z rodzaju: *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, i in. (14 i prace tam cytowane).

Szczegółowe obserwacje wskazują, m.in., że metabolity bifidobakterii hamują rozwój bakterii patogennych np. *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Veillonella*, *Shigella*, *Listeria* itp. (5,15). W szczegółowych badaniach ustalono, że spośród 13. różnych grup bakterii największy inhibujący efekt w odniesieniu do sześciu badanych, najbardziej popularnych serotypów *Salmonelli* miały kolejno: *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* i bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (15).

Do niedawna, zarówno w piśmiennictwie, jak i w praktyce użytkowania drobiu, ograniczano się do podawania wspomnianych dodatków w paszy lub wodzie, najwcześniej pisklątom jednodniowym. Jednakże ten sposób nie zawsze gwarantuje uzyskanie oczekiwanych wyników (16,17). Wskazuje się na niekorzystne interakcje pomiędzy oddziaływaniem różnych dodatków paszowych: oligosacharydów, antybiotyków, stymulatorów wzrostu lub kokcydiostatyków. Uważa się, że brak korzystnych efektów może być spowodowany przynajmniej kilkoma czynnikami: a) różnym składem chemicznym oligosacharydów, b) różnym źródłem ich pozyskiwania, c) interakcją z innymi składnikami paszy, d) niekorzystnym oddziaływaniem środowiska, e) wcześniejszą kontaminacją drobnoustrojami chorobotwórczymi.

We wcześniejszych pracach zaproponowaliśmy z jednej strony model zarodka kury *in ovo* do testowania funkcji biologicznych różnych związków chemicznych (18,19), z drugiej zaś skorzystaliśmy, współpracując z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN, z prostej i szybkiej metody izolacji i oczyszczania oligosacharydów rodziny rafinozy (ORR), o właściwościach prebiotycznych (20). W naszych kilkuletnich badaniach laboratoryjnych wykazaliśmy, że model ten jest przydatny w ocenie oddziaływania prebiotycznego ORR na organizm kurczęcia. Nasz zespół jako pierwszy wykazał (5,21), że prebiotyk może być z powodzeniem podawany w trakcie rozwoju embrionalnego, poprzez iniekcję do komory powietrznej w 12. dobie lęgu, zastępując antybiotykowe stymulatory wzrostu i kształtując korzystny profil bakteryjny jelita grubego. Jednorazowa iniekcja ORR w 12. dobie rozwoju zarodkowego pozwalała na utrzymywanie wysokiego poziomu korzystnych bakterii przez sześć tygodni (okres odchowu brojlerów), przy czym śmiertelność ptaków w porównaniu z grupą kontrolną spadła o ok. 50% (21).

Pozytywne wyniki, uzyskane w warunkach laboratoryjnych, znajdują obecnie potwierdzenie w badaniach prowadzonych na skalę przemysłową (22). Na podstawie

wyników doświadczeń przeprowadzonych na ponad 300 000 szt. brojlerów dowiedziono, że ORR podawane *in ovo*, pozwalają na uzyskanie poprawy parametrów produkcyjnych takich jak przeżywalność (3,18% upadków w grupie ORR vs 3,60% upadków w grupie kontrolnej) czy lepsze wykorzystanie paszy (1,78 zużycie paszy / kg przyrostu w grupie ORR vs. 1,85 zużycie paszy/kg przyrostu w grupie kontrolnej). Wyniki te są niezmiernie istotne z praktycznego punktu widzenia, gdyż zarówno jednorazowe podanie niewielkiej dawki prebiotyku, jak i mniejsze upadki oraz lepsze wykorzystanie paszy, wpływają na obniżenie kosztów produkcji drobiarskiej. Dzięki temu, testowana przez nas technologia *in ovo* ma duże szanse na komercjalizację. W dalszych, pilotażowych, nie publikowanych badaniach własnych ugruntowano wcześniejsze obserwacje, uzupełniając je o analizy histologiczne i morfologiczne. Wykazano, np. szybsze wchłanianie się woreczka żółtkowego podczas embriogenezy, w stosunku do kontroli oraz pozytywny wpływ na parametry kosmków jelitowych.

Podsumowując tę część pracy, należy podkreślić, że podawanie prebiotyków pochodzenia roślinnego, o ściśle określonym składzie chemicznym, z zastosowaniem technologii *in ovo*, wpływa istotnie na efektywność odchowu kurcząt rzeźnych, pozwalając na produkcję żywności prozdrowotnej, dzięki wyeliminowaniu niekorzystnych właściwości dotychczas stosowanych antybiotyków w paszy.

4. Stymulacja odpowiedzi immunologicznej

Wylężone piskląta narażone jest, w wyniku kontaktu z niekorzystnymi czynnikami środowiska, na szereg czynników chorobotwórczych. Toteż zagadnienia dotyczące jego zdrowotności są jednym z najważniejszych współczesnych problemów związanych z hodowlą i użytkowaniem drobiu. Ich rola jeszcze wzrosła, po wprowadzeniu w UE, w latach 1997-1998 zakazu stosowania jako dodatków paszowych chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu ludzi. Do grupy tej zaliczamy: awoparcynę, tylozynę, spiramycynę, bacytracynę, i wirginiamycynę (No VI/7767/98 EC, Bruksela). Od 1 stycznia 2006 r. na terytorium UE zakazem (No A5-0373/2002) zostały objęte pozostałe antybiotyki, które odtąd nie mogą być stosowane jako stymulatory wzrostu dla zwierząt. Decyzja ta stanowi podstawowy element strategii Komisji Europejskiej mającej zapobiec zjawiskom uodparniania się mikroorganizmów w związku z nadmiernym bądź niewłaściwym stosowaniem antybiotyków. Obecnie dozwolone jest stosowanie antybiotyków wyłącznie w ramach kuracji weterynaryjnych.

Ponadto, począwszy od 2007 r., we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej wdrażane są narodowe programy zwalczania salmonelloz u drobiu. Dotyczą one zwalczania *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow*, *S. infantis* i *S. hadar* w stadach hodowlanych gatunku *Gallus gallus*. W Polsce zasady dotyczące realizacji programu zwalczania salmonella w stadach hodowlanych zostały określone w rozporządzeniu Rady Ministrów z 28 marca 2007 r. Natomiast program zwal-

czania salmonelloz u brojlerów kurzych oraz niosek kur towarowych wdrożony został na podstawie Rozporządzenia Rady Ministrów z 12 maja 2009 r. Przepisy te zakazują stosowania antybiotyków w celu zwalczania i leczenia salmonelloz u drobiu. Zalecane są szczepienia ochronne oraz stosowanie preparatów zasiedlających i kompetencyjnych wobec bakterii z grupy *Salmonella*.

Omawiana tematyka wpisuje się w aktualne priorytety badawcze Unii Europejskiej, o czym świadczy m.in. powołanie jednej z Europejskich Platform Technologii (ETP, ang. *European Technology Platform*), poświęconej wytyczaniu trendów w nowoczesnej hodowli zwierząt, zwanej FABRE TP (ang. *Sustainable Farm Animal Breeding and Reproduction Technology Platform*). Platforma ta została stworzona przez przedstawicieli największych organizacji zajmujących się hodowlą zwierząt w Europie, we współpracy z uniwersytetami i ośrodkami badawczymi (23). W dokumencie opublikowanym na stronie internetowej platformy FABRE, <http://www.fabretp.org/>, przedstawiającym wizję zrównoważonego rozwoju hodowli i reprodukcji zwierząt gospodarskich do roku 2025, wyszczególniono priorytety, które powinny wyznaczać kierunki działania tej gałęzi produkcji rolniczej. Obejmują one m.in. bezpieczeństwo żywności, zwierzęta wolne od chorób, bioróżnorodność, odpowiedzialność społeczną i konkurencyjność ekonomiczną Europy. W świetle tego dokumentu, głównym wyznacznikiem działań w zakresie hodowli zwierząt jest ograniczanie występowania zoonoz i pozostałości farmaceutyków w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego, jak również zwiększanie odporności zwierząt gospodarskich na czynniki patogenne poprzez odpowiednią selekcję, ograniczanie stosowania leków weterynaryjnych, optymalizację programów szczepień oraz stosowanie nowoczesnych technologii. W związku z prężną działalnością platformy, można w najbliższym czasie spodziewać się odzwierciedlenia tych idei w finansowaniu i wdrażaniu projektów badawczych dotyczących immunologii i immunogenetyki zwierząt gospodarskich.

Rozważmy w tym miejscu przesłanki wskazujące na zasadność stymulacji odpowiedzi immunologicznej kurcząt/ptaków z wykorzystaniem technologii *in ovo*. W wieloletnich badaniach wykazano, że geneza powstawania przeciwciał w organizmie ptaka różni się znacznie od analogicznego procesu u ssaków. Przede wszystkim proces rearanżacji genów immunoglobulin w przypadku ssaków jest ciągły i trwa całe życie osobnicze, natomiast u ptaków występuje tylko raz, podczas rozwoju embrionalnego i jest znany pod nazwą somatycznej konwersji genów. U kury, prekursorzy wytwarzających przeciwciała limfocytów B (ang. *Prebursal Stem Cells*), są syntetyzowane między 8. a 14. dniem embriogenezy w pęcherzyku żółtkowym, szpiku kostnym i embrionalnej tkance wątrobowej. Następnie zasiedlają pęcherzyki bursy Fabrycjusza, gdzie podlegają różnicowaniu i klonowaniu do poziomu szacowanego na $2-3 \times 10^4$ szt. Proces ten rozpoczyna się w 12. dniu rozwoju embrionalnego i trwa przez kilka następnych tygodni. Między 18. dniem embriogenezy a 2.-4. tygodniem życia większość limfocytów B migruje z bursy Fabrycjusza do grasicy oraz do wtórnych narządów limfatycznych, dzięki czemu już 2-4-tygodniowe kurczęta rozwijają bardzo wszechstronną odporność nieswoistą (24,25). Między 7. a 13. tygodniem życia

kurcząt, bursa Fabrycjusza – po spełnieniu swoich funkcji związanych z różnicowaniem i proliferacją limfocytów B – zaczyna zanikać.

Stymulacja odporności specyficznej kurczęcia możliwa jest w wyniku podania szczepionki, np. w formie inaktywowanych wirusów lub jedynie pewnych składników patogenów np. krótkich oligodeoksynukleotydów zawierających niemetylowane motywy CpG (charakterystyczne dla bakterii) stymulujące odporność specyficzną (26). Motywy CpG należą do konserwatywnych elementów występujących na powierzchni patogenów (PAMP). To właśnie poprzez PAMP receptory TLR (Toll-podobne), związane z odpornością nieswoistą, aktywują komórki układu odpornościowego (27).

Współczesne ptaki poddawane są starannie przemyślanej strategii szczepień, różnej w zależności od gatunku, wieku, kierunku użytkowania, itd. Stosuje się m.in. szczepionki przeciwko chorobie Mareka, zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza, ospie ptasiej, pomorowi rzekomemu ptaków (pomór azjatycki), zakaźnemu zapaleniu oskrzeli kur (IBV) czy kokcydiozie (6,28,29). Niebezpieczna, zwłaszcza dla kulkodniowych piskląt, powodująca duże straty w wielkostadnej produkcji drobiarskiej jest nowotworowa choroba wywoływana przez wirusy z rodziny Herpesviridae, nazwana od nazwiska jej odkrywcy – chorobą Mareka (MD). Podanie szczepionki przeciwko MD w pierwszym dniu życia pisklęcia powoduje wytworzenie odporności dopiero po siedmiu dniach od szczepienia (30).

W tym kontekście bardzo ważne jest jak najwcześniejsze podanie szczepionki, aby stymulacja odpowiedzi immunologicznej nastąpiła przed ewentualnym zakażeniem zjadliwymi, terenowymi szczepami drobnoustrojów. Okazało się, że okres potrzebny do zabezpieczenia piskląt przed skutkami zakażenia wirusem MD po szczepieniu *in ovo* ulega skróceniu i wynosi około trzech dni. Podanie szczepionki *in ovo*, najczęściej w 18. dobie lęgu lub nawet wcześniej w 12.-14. dobie, kiedy następuje rozwój komórek prekursorowych limfocytów T i B (30) ma zatem swoje uzasadnienie. Podstawową zaletą jest wcześniejszy rozwój odporności pisklęcia oraz redukcja stresu w stosunku do tradycyjnych szczepień, możliwość automatyzacji procesu, obniżenie kosztów, jak również precyzyjne dostarczanie wymierzonych składników (4,6). W dalszych badaniach wykazano (26), że podanie sekwencji lub/i rekombinowanych białek pierwotniaka *Eimeria*, zmniejsza wrażliwość piskląt na zakażenie. Również inni badacze (32) osiągnęli porównywalne wyniki, zwiększenie poziomu odpowiedzi humoralnej w rezultacie podania nieszkodliwionych termicznie bakterii *Campylobacter jejuni*.

W przypadku szczepienia *in ovo* ważna jest dawka, rodzaj substancji, jak również miejsce podania szczepionki oraz wiek zarodka (30). Wykazano, np. że w przypadku MD skuteczniejsze są iniekcje do mięśnia grzbietowego zarodka w porównaniu do iniekcji do płynów zarodkowych (33). Obecnie badane są szczepionki różnego typu, np. konstruowane z wykorzystaniem wirusów, ale w formie kombinacji wirus-przeciwciała, które, jak się okazuje, są bezpieczniejsze. Zwiększenia poziomu przeciwciał u zarodków/piskląt można się spodziewać w wyniku stymulacji torby Fabrycjusza, czy też innych organów limfatycznych związanych z tkanką limfatyczną występującą w obrębie przewodu pokarmowego (GALT, ang. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) lub

tkanką limfatyczną związaną z błonami śluzowymi – MALT (ang. *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) (34,35). W innych badaniach skupiono się na podawaniu w szczepionce interferonu gamma, chcąc pobudzić produkcję przeciwciał, poprzez zwiększenie ekspresji kompleksu MHC i rozwoju limfocytów Tc, eliminujących patogen (28).

Poszukanie odpowiednich środków w celu podwyższenia poziomu odporności *in ovo* jest obecnie aktualnym i ważnym zagadnieniem, z powodu braku, na użytek przemysłu drobiarskiego, wyspecjalizowanych, skutecznych i zarazem bezpiecznych, szczepionek zwalczających choroby wirusowe. Ograniczeniem jest stosunkowo mała, jak dotąd, wiedza dotycząca mechanizmów wrodzonej odporności kurcząt (36).

Szczegółowe badania dotyczące efektu immunomodulacyjnego i działania probiotyków na poszczególne szlaki odpowiedzi immunologicznej poprzez stymulację ekspresji genów prowadzone były głównie *in vitro*. Jednym z nielicznych przykładów mogą być badania Brisbin i wsp. (37), w których przeanalizowano wpływ bakteryjnego DNA, peptydoglikanu jak i cząsteczki otoczki probiotycznej bakterii *Lactobacillus acidophilus*. Wykazano, że cząstki *Lactobacillus* w tkance limfatycznej jelita ślepego kur wpływają na zwiększoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną m.in. STAT 1 i STAT 4, interleukiny 18 (IL-18), MyD88, interferonu INF- α oraz INF- γ , CD44, CD25, MHC klasy 1 łańcuch ciężki oraz lekki (β 2-mikroglobulina). Równolegle prowadzone w naszym zespole badania (38-40) dotyczące mapowania genów związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną pozwoliły na wytypowanie genów kandydujących. Wykazaliśmy także, że zarówno swoista jak i nieswoista odpowiedź immunologiczna ma podłoże genetyczne. Wartości odziedziczalności odpowiedzi immunologicznej są niskie (0,2), co sugeruje znaczący wpływ środowiska na te cechy. Takim stymulatorem środowiskowym, szczególnie efektywnym w czasie embriogenezy, może być odpowiednio dobrany pre-/ probiotyk lub synbiotyk.

W nie publikowanych badaniach własnych ugruntowaliśmy wcześniejsze obserwacje, uzupełniając je o analizy immunologiczne. Objęły, z jednej strony, ocenę narządów układu immunologicznego, a z drugiej, wyniki analiz serologicznych. Masa ciała, torby Fabrycjusza i śledziony w 3. tygodniu życia brojlerów była większa w grupie, w której podano prebiotyk *in ovo*. Poziom przeciwciał przeciwko chorobie Gumboro IBD, pomorowi rzekomemu ND oraz przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli IBV w surowicy 6-tygodniowych ptaków był statystycznie wyższy w grupie, w której podano *in ovo* prebiotyk, odpowiednio: 123, 93 i 242, wobec 82, 44 i 165.

5. Podsumowanie

Główne znaczenie omawianego zagadnienia polega naszym zadaniem na wykroczeniu, dzięki zastosowaniu technologii *in ovo*, poza dotychczasowy nurt, dotyczący przede wszystkim stosowania pre- /pro- / synbiotyków w paszy, głównie w celu oceny efektów produkcyjnych i obserwacji związanych z wpływem tych dodatków paszowych na układ immunologiczny. Stosunkowo niewiele wiadomo

natomiast o molekularnych mechanizmach działania, zwłaszcza synbiotyków, na układ immunologiczny, dlatego kontynuacja tych badań pozwoli uzupełnić jak sądzimy tę lukę informacyjną. Umożliwi też zupełnie nowe podejście do zagadnienia molekularnego mechanizmu działania synbiotyków na układ immunologiczny ptaka już w czasie jego kształtowania się w okresie rozwoju zarodkowego. Mechanizm wczesnej modulacji systemu immunologicznego w wyniku działania np. synbiotyku będzie mógł być analizowany na podstawie analizy ekspresji genów, m.in. ze szlaku odpowiedzi TLR, jak również na parametrach immunologicznych. Wytypowane geny kandydujące, których ekspresja pod wpływem stymulacji synbiotykiem będzie podlegała modyfikacji, w przyszłości stanowiąc mogą bioindykatory działania dodatków paszowych. Takie bioindykatory umożliwią łatwiejsze i skuteczniejsze typowanie substancji biologicznie czynnych stosowanych w programach użytkowania ptaków.

Praca wykonana w ramach projektu nr R12 035 02 oraz projektu NN 311 623938 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Literatura

1. Perry M. M., (1987), J. Anatomy, 150, 99-109.
2. Jura C., Krzanowska H., Rzehak K., (1985), *Podstawy embriologii zwierząt*, PWN, Warszawa, 1-520.
3. Stępińska U., Olszańska B., (1983), J. Exp. Zool., 228, 505-510.
4. Ricks C. A., Avakian A., Bryan T., Gildersleeve R., Haddad E., Ilich R., King S., Murray L., Phelps P., Poston R., Whitfill C., Williams C., (1999), Adv. Vet. Med., 41, 495-515.
5. Villaluenga C. M., Wardeńska M., Pilarski R., Bednarczyk M., Gulewicz K., (2004), Folia Biol., 52(3-4), 136-142.
6. Ricks C. A., Mendu N., Phelps P. V., (2003), Poult. Sci., 82, 931-938.
7. de Oliveira J. E., (2007), *Effects of in ovo feeding on turkey embryos development, energy status, intestinal maturation, gene expression and post-hatch development*, PhD thesis, North Carolina State University.
8. Wilhelms K. W., Fitzpatrick K. F., Scanes C. G., Anderson L. L., (2006), Arch Environ Contam Toxicol., 51(1), 117-122.
9. Klein S., Ellendorff F., (1998), Br. Poult. Sci., 39, 482-487.
10. Ewachuk J. B., Dieleman L. A., (2006), World J. Gastroenterol., 12, 2941-2950.
11. Watzl B., Girrback S., Roller M., (2005), British J. Nutr., 93, Suppl. 1, 49-55.
12. Awad W., Ghareeb K., Böhm J., (2008), Int. J. Mol. Sci., 9(11), 2205-2216.
13. Awad W. A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S., Böhm J., (2009), Poult. Sci., 88, 49-56.
14. Tomomatsu H., (1994), Food Technol., 48, 61-65.
15. Oyarzabal O. A., Conner D. E., (1995), Poultry Sci., 74, 1418-1425.
16. Jamroz D., Wiliczekiewicz A., Skorupińska J., Orda J., (1997), Rocz. Nauk. Zoot., 24, 251-263.
17. Waldroup A. L., Skinner J. T., Hierholzer R. E., Waldroup P. W., (1993), Poult. Sci., 72, 643-650.
18. Bednarczyk M., Karasiński D., Mazanowski A., Gulewicz K., (1987), Arch. Geflügelk., 51(5), 185-189.
19. Bednarczyk M., Lisowski M., Siwek M., Uziębło L., Stobiecki M., Gulewicz K., (1996), Bull. Polish Acad. Sci. Chem. Sci., 44 (2), 71-83.
20. Gulewicz P., Ciesiolka D., Frias J., Vidal-Valverde C., Frejnagel S., Trojanowska K., Gulewicz K., (2000), J. Agric. Food Chem., 48, 3120-3123.
21. Pilarski R., Bednarczyk M., Lisowski M., Rutkowski A., Bernacki Z., Gulewicz K., (2005), Folia Biol., 53, (1-2), 13-20.

22. Bednarczyk M., Gulewicz K., Maiorano G., Kasperczyk K., Urbanowski M., (2009), *Ital. J. Anim. Sci.*, 8 (Suppl. 2), 808.
23. www.euroqualityfiles.net/vision_pdf/vision_fabre.pdf
24. Weill J., Reynaud C., (1987), *Science*, 238, 1094-1098.
25. McCormack W. T., Thompson C. B., (1990), *Adv. Immunol.*, 48, 41-67.
26. Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Klinman D. M., Ding X., Min W., Heckert R. A., Lillehoj E. P., (2005), *Vaccine*, 23, 3108-3113.
27. Beutler B., (2005), *Immunogenetics*, 57, 385-392.
28. Hackney K., Cavanagh D., Kaiser P., Britton P., (2003), *Journal of Virology*, 77, 5694-5702.
29. Haddad E. E., Whitfill C., Avakian A., Ricks C. A., Andrews P. D., Thoma J. A., Wakenell P. S., (1997), *Avian Dis.*, 41, 882-889.
30. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdruń K., Król K., (2007), *Medycyna Wet.*, 63, 827-830.
31. Cormier F., (1993), *J. Cell Sci.*, 105, 661-666.
32. Noor S. M., Husband A. J., Widders P. R., (1995), *Br. Poult. Sci.*, 36, 4, 563-573.
33. Zhang Y., Sharma J. M., (2003), *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 431-438.
34. Dent P. B., Perey D. Y. E., Cooper M. D., Good R. A., (1968), *J. Immunol.*, 101, 799-805.
35. Yegani M., Korver D. R., (2008), *Poult. Sci.*, 87, 2052-2063.
36. Jenkins K. A., Bean A. G. D., Lowenthal J. W., (2007), *Cytogenet. Genome Res.*, 117, 207-212.
37. Brisbin J. T., Zhou H., Gong J., Sabour P., Akbari M. R., Haghghi H. R., Yu H., Clarke A., Sarson A. J., Sharif S., (2008), *Dev. Comp. Immunol.*, 32(5), 563-574.
38. Siwek M., Buitenhuis A. J., Cornelissen S. J., Nieuwland M. G., Bovenhuis H., Crooijmans R. P., Groenen M. A., de Vries-Reilingh G., Parmentier H. K., van der Poel J. J., (2003a), *Poult. Sci.*, 82, 1845-1852.
39. Siwek M., Cornelissen S. J., Nieuwland M. G., Buitenhuis A. J., Bovenhuis H., Crooijmans R. P., Groenen M. A., de Vries-Reilingh G., Parmentier H. K., van der Poel J. J., (2003b), *Anim Genet.*, 34(6), 422-428.
40. Sławińska A., (2009), *Badania nad genetycznymi podstawami odporności u kur*, praca doktorska, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz.