

UNIwersytet
Technologiczno-Przyrodniczy
Im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
w Bydgoszczy



Wydział Hodowli
i Biologii Zwierząt



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Arkadiusz Płowiec

WPŁYW PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW
PODANYCH *IN OVO*
NA ZMIANĘ EKSPRESJI GENOMU KURY

PROMOTOR

DR HAB. MARIA SIWEK-GAPIŃSKA, PROF. NADZW. UTP

PROMOTOR POMOCNICZY

DR HAB. INŻ. ANNA SŁAWIŃSKA

BYDGOSZCZ
2017

*Praca powstała w ramach projektu Nr 2011/01/B/NZ9/00642
pt.: „Stymulacja in ovo mikrobiomu kury – charakterystyka działania
prebiotyków i synbiotyków”.*

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani dr hab. Marii Siwek-Gapińskiej oraz dr inż. Annie Sławińskiej za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowania pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość. Pragnę również podziękować za czas poświęcony na konsultacje oraz za pomoc w redagowaniu pracy.

Pragnę również wyrazić swoją wdzięczność Pracownikom Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, którzy służyli pomocą, dobrą radą oraz wsparciem.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	11
2. PRZEGLĄD LITERATURY	13
2.1. MIKROBIOM	13
2.2. INTERAKCJE GOSPODARZ-MIKROBIOM.....	15
2.3. MOŻLIWOŚCI STYMULACJI MIKROBIOMU	16
2.3.1. Podawanie prebiotyków, probiotyków, synbiotyków	17
2.3.1.1. W paszy i wodzie	17
2.3.1.2. <i>In ovo</i>	17
2.4. CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI PROBIOTYCZNYCH MIKROORGANIZMÓW.....	18
2.4.1. Ocena właściwości <i>in vitro</i>	19
2.4.2. Ocena właściwości <i>in vivo</i>	19
3. MATERIAŁY I METODY	21
3.1. OCENA WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOSTYMULUJĄCYCH BAKTERII – BADANIA <i>IN VITRO</i>	21
3.1.1. Przygotowanie linii komórkowej	21
3.1.2. Przygotowanie probiotyków do stymulacji linii komórkowej... 21	
3.1.3. Oznaczenie poziomu ekspresji receptorów Toll-podobnych w linii komórkowej - RT-qPCR	24
3.1.4. Stymulacja linii komórkowej, izolacja i ocena RNA	26
3.1.5. Analiza transkryptomu linii komórkowej po stymulacji probiotykami – całogenomowa mikromacierz ekspresyjna	26
3.1.6. Walidacja wyników mikromacierzy za pomocą RT-qPCR.....	27
3.2. TEST PRZENIKANIA PREBIOTYKÓW I PROBIOTYKÓW PODANYCH <i>IN OVO</i>	28
3.2.1. Przygotowanie barwnika i probiotyku.....	28
3.2.2. Iniekcja <i>in ovo</i>	29

3.2.3. Ocena przenikania barwnika z komory powietrznej do wnętrza jaja.....	29
3.2.4. Wykrywanie bakterii w błonie podskorupowej, płynie owodniowym i przewodzie pokarmowym	29
3.3. OCENA WPŁYWU PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW PODANYCH <i>IN OVO</i> NA TRANSKRYPTOM KURY	30
3.3.1. Iniekcja <i>in ovo</i> prebiotyku i synbiotyku	30
3.3.2. Odchów i pobieranie prób	32
3.3.3. Analizy molekularne	34
3.3.3.1. Analiza Punku czasowego – RT-qPCR.....	34
3.3.3.2. Całogenomowa mikromacierz ekspresyjna.....	34
3.3.3.3. Analiza wyników mikromacierzy.....	35
3.3.3.4. Walidacja wyników mikromacierzy przy pomocy RT-qPCR.....	35
4. WYNIKI.....	37
4.1. OCENA WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOSTYMULUJĄCYCH BAKTERII NA MODELU <i>IN VITRO</i>	37
4.1.1. Charakterystyka receptorów linii komórkowej HD11.....	37
4.1.2. Ilościowa charakterystyka zmian w transkrypcji linii HD11.....	38
4.1.3. Funkcjonalna analiza zmian w transkrypcji linii HD11	40
4.2. TEST PRZENIKANIA BARWNIKA I BAKTERII PROBIOTYCZNYCH.....	47
4.3. WPŁYW PREBIOTYKU I SYNBIOTYKU, PODANEGO <i>IN OVO</i> , NA EKSPRESJĘ GENÓW ZWIĄZANYCH Z UKŁADEM IMMUNOLOGICZNYM W CZASIE ROZWOJU OSOBNICZEGO KURCZĄT BROILERÓW	49
4.4. WPŁYW PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW PODANYCH <i>IN OVO</i> NA TRANSKRYPTOM DOROSŁYCH KURCZĄT BROILERÓW	52
4.4.1. Ilościowa charakterystyka zmian w transkrypcji kurcząt broilerów.....	52

4.4.2. Funkcjonalna analiza zmian w transkryptomie kurcząt broilerów	55
4.5. WALIDACJA WYNIKÓW MIKROMACIERZY PRZY POMOCY RT-QPCR.....	68
5. DYSKUSJA.....	69
5.1. INIEKCJA <i>IN OVO</i> – MIGRACJA PREBIOTYKU I PROBIOTYKU	69
5.2. WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOSTYMULUJĄCE PROBIOTYKÓW.....	70
5.3. WPŁYW PREBIOTYKU I SYNBIOTYKU NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY W CIĄGU ŻYCIA BROILERÓW	74
5.4. WPŁYW PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW NA TRANSKRYPTOM ŚLEDZIONY, JELITA GRUBEGO I MIGDAŁKÓW JELIT ŚLEPYCH	76
6. WNIOSKI	80
SPIS PIŚMIENNICTWA.....	81
STRESZCZENIE	93

1. WSTĘP

Wprowadzenie w krajach Unii Europejskiej zakazu stosowania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu w 2006 roku, pod wpływem zagrożenia wynikającego z powstawania nowych szczepów bakterii lekoopornych, wymusiło poszukiwanie nowych, bezpiecznych dodatków paszowych. Szczególnym zainteresowaniem w tym kontekście cieszą się probiotyczne bakterie, których zadaniem jest: przywrócenie i zachowanie równowagi naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego [Holzapfel i wsp. 1998; Macfarlane i Cummings 1999], produkcja bakteriocyn [Dobson i wsp. 2012], wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów organicznych [P. M. Smith i wsp. 2013], synteza witamin [LeBlanc i wsp. 2011], zmniejszenie stężenia substancji toksycznych [El-Nezami i wsp. 1998], obniżanie pH treści jelit, poziomu cholesterolu, trójglicerydów [Mohan i wsp. 1995], ochrona przewodu pokarmowego przed patogenami [Foye i wsp. 2012; Resta-Lenert i Barrett 2003], w tym przed szkodliwymi dla zwierząt i człowieka jak *Salmonella* [Feng i wsp. 2016], a także stymulacji układu immunologicznego [Isolauri i wsp. 2001]. Podawanie substancji stanowiących źródło węgla dla bakterii probiotycznych (prebiotyków), stymuluje rozwój korzystnej mikroflory, która już znajduje się w przewodzie pokarmowym, co przekłada się na jej większy udział procentowy w ogólnej liczbie bakterii. Dzięki temu procesowi efekt podawania prebiotyków, dla gospodarza, może być podobny jak ten wywołany podawaniem probiotyków [Saad i wsp. 2013; Druart i wsp. 2014]. W pracach badawczych często opisywane są efekty końcowe podawania prebiotyków, probiotyków i synbiotyków (połączenie prebiotyku i probiotyku w jeden produkt) takie jak zużycie paszy, przyrost wagi, upadki, a nawet struktura jelit i mięśni [Budiño i wsp. 2005; Midilli i wsp. 2008; Ohimain i Ofongo 2012]. Badania te nie wyjaśniają jednak w sposób jednoznaczny jakie mechanizmy leżą u podstaw tych zmian. Dlatego też w niniejszej pracy zbadano wpływ podania prebiotyków i synbiotyków *in ovo* na ekspresję genomu kury, celem wytypowania szlaków sygnałowych na które mają wpływ podane substancje biologicznie aktywne. W badaniach wykorzystana została technologia *in ovo*, która zakłada podanie substancji biologicznie aktywnej (w tym przypadku prebiotyku i synbiotyku) do komory powietrznej jaja w 12 dobie rozwoju zarodkowego.

HIPOTEZA

Stymulacja mikrobiomu kury prebiotykami i synbiotykami podanymi *in ovo* wpływa na poziom ekspresji genów.

Do weryfikacji powyższej hipotezy badawczej zastosowane zostały dwa modele badawcze: *in vitro* i *in vivo*. Pierwszy z modeli zakładał wykorzystanie linii komórkowej kurczących makrofagów (HD11) do oceny aktywności biologicznej probiotyków. Drugi z modeli wykorzystał technologię *in ovo* do podania substancji biologicznie aktywnych (prebiotyków i synbiotyków) do komory powietrznej jaja.

Aby zweryfikować powyższą hipotezę, postawiono następujące pytania badawcze:

- Czy różne probiotyczne szczepy bakteryjne wykazują zróżnicowany potencjał do immunostymulacji komórek gospodarza? (badania *in vitro*).
- Czy prebiotyk i bakterie probiotyczne podane *in ovo* do komory powietrznej jaja przenikają przez błonę podskorupową do wnętrza jaja? (badania na embrionach).
- Jak zmienia się ekspresja genów związanych z układem immunologicznym po podaniu *in ovo* prebiotyku i synbiotyku w czasie życia broilerów (badania *in vivo*)?
- Jakie zmiany w transkryptomie wywołuje podanie prebiotyków i synbiotyków *in ovo* (badania *in vivo*)?

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. MIKROBIOM

Ciało człowieka i zwierząt, nie składa się tylko z komórek organizmu lecz także licznej grupy drobnoustrojów, zwanych mikrobiomem. Zgodnie z terminem wprowadzonym przez Joshuę Lederberga na przełomie XX i XXI wieku, mikrobiom jest zbiorem mikroorganizmów zasiedlających dane siedlisko [Lederberg i Mccray 2001]. Mikrobiom człowieka i zwierząt tworzą wszystkie drobnoustroje saprofityczne, komensale i pasożyty, które zasiedlając przestrzeń w ciele, wykształcają wzajemne zależności oraz interakcje. Mikroorganizmy te nie są przypadkowo rozmieszczone w organizmie, lecz lokalizują się w ściśle określonych miejscach, np. przewód pokarmowy, skóra, układ rozrodczy, czy górne drogi oddechowe. Szacunkowa liczba komórek mikroorganizmów (prokariotycznych i eukariotycznych) kolonizujących przewód pokarmowy jest wielokrotnie większa niż liczba komórek budujących organizm samego gospodarza [Savage 1977]. Odkrycie, iż mikrobiom człowieka i zwierząt moduluje rozwój a także różnorodne funkcje organizmu, przyczyniło się do wzrostu liczby badań związanych z tą tematyką [Huttenhower i Human Microbiome Project Consortium 2012].

W przewodzie pokarmowym zwierząt i człowieka występują setki gatunków drobnoustrojów, w przeważającym odsetku jest to mikroflora komensalna, w mniejszym występują gatunki drobnoustrojów patogennych [Sekirow i wsp. 2010]. Zarówno komensale, jak i patogeny odpowiadają za stymulację miejscowej i ogólnej odporności przeciwwakażnej [Flint i wsp. 2012]. Wydzielnicze IgA oraz mukopolisacharydy śluzu jelitowego tworzą warstwę chroniącą nabłonek jelit. Do ich funkcji należy neutralizowanie szkodliwych produktów powstających podczas niszczenia bakterii, zubożnianie działania toksyn, enzymów proteolitycznych, alergenów i składników pokarmowych o właściwościach antygenów [Inoue i wsp. 2005]. Bakterie jelitowe pobudzają produkcję czynnika martwicy nowotworów (TNF), który wpływa na aktywność limfocytów i metabolizm komórek, a także na apoptozę komórek nowotworowych [Bengmark 2013].

Autochtoniczna mikroflora jelit w ponad 90% jest utworzona przez bezwzględne beztlenowce, głównie, a niekiedy wyłącznie, przez producentów kwasu mlekowego (*Bifidobacterium/Lactobacillus*) i producentów lotnych kwasów tłuszczowych (*Bacteroidaceae, Eubacterium*). U człowieka *Bacteroides* stanowią około 30% wszystkich drobnoustrojów przewodu pokarmowego. 1 g treści okrężnicy człowieka zawiera 1012 bakterii, a około 30% treści okrężnicy tworzy *E. coli*. W skład mikroflory pomocniczej (ang. *satellite flora*), stanowiącej poniżej 1% ogólnej ilości bakterii, wchodzi

fakultatywne beztlenowce (*E. coli* i enterokoki), zaś 0,01% mikroflory to *Clostridia*, *Proteus*, gronkowce, *Pseudomonas*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* oraz *Penicillium* [Hao i Lee 2004; Tiihonen i wsp. 2010]. Bakterie jelitowe fermentują niestrawione węglowodany, kwasy żółciowe i sterole, a komensale produkują biotynę i witaminę K. Bakterie jelitowe produkują hormony wpływające na odkładanie się tłuszczu w organizmie [Turnbaugh i Gordon 2009]. Dzięki współzawodnictwu o pokarm i miejsce mikrobiom jelit hamuje namnażanie patogenów (np. *C. difficile*, *Candida*). Działanie przeciwbakteryjne wywierają również bakteriocyny produkowane przez autochtoniczną mikroflorę jelit [Chow i wsp. 2010].

2.2. INTERAKCJE GOSPODARZ-MIKROBIOM

Mikrobiom u ssaków zaczyna rozwijać się częściowo już w życiu płodowym, lecz główny rozwój następuje po porodzie, gdy młody organizm ma kontakt z mikroflorą narządów płciowych i skóry matki. Od tej chwili w niszach nowonarodzonego organizmu zaczyna się współzawodnictwo o miejsce i pokarm między mikroorganizmami, co prowadzi do stymulacji odporności naturalnej i nabytej [Olszak i wsp. 2012]. Natomiast w przypadku ptaków, główny kontakt młodego organizmu z mikroflorą, zaczyna się w chwili wyklucia [Klasing 2007]. Aczkolwiek badania Pedrosa [Pedrosa 2009] dowodzą iż w zarodku kurczęcym znajduje się niewielka liczba bakterii zlokalizowanych w woreczku żółtkowym.

Mikrobiom jelit odgrywa kluczową rolę w zainicjowaniu i ciągłej stymulacji odporności miejscowej i ogólnej organizmu [Chung i wsp. 2012]. Bakterie, które kolonizują przewód pokarmowy jako pierwsze (zaraz po urodzeniu w przypadku ssaków lub po wykluciu w przypadku ptaków), w dużym stopniu decydują o składzie mikrobiomu w ciągu całego życia i charakterze odpowiedzi immunologicznej [Kuhn i Stappenbeck 2013]. Badania na myszach gnotobiotycznych (pozbawionych bakterii) jednoznacznie potwierdzają znaczenie mikrobiomu w odporności miejscowej – nieswoistej wywołanej przez czynniki lub zjawiska występujące tylko lokalnie [Carragher i wsp. 2008]. Działanie ochronne na zakażenie salmonellami jest wyższe u myszy z typową mikroflorą przewodu pokarmowego niż u myszy o zmienionym mikrobiomie, np. skolonizowanym przez mikrobiom pochodzący od człowieka [Chung i wsp. 2012]. Bakterie przewodu pokarmowego wykazują szerokie spektrum działania, łącznie z wpływem na układ immunologiczny. Stymulują bowiem zarówno swoiste, jak i nieswoiste mechanizmy odporności organizmu, wpływając na tkankę limfatyczną związaną z błonami śluzowymi (ang. MALT - *mucosal associated lymphoid tissue*). Stymulują syntezę przeciwciał klas: IgG, IgM i IgA, a także SIgA i SIgM. Bakterie zapobiegają również adhezji patogenów do nabłonka śluzówki jelit i wnikaniu w głąb błon śluzowych. Bakterie saprofityczne przewodu pokarmowego hamują generowanie reakcji zapalnej, jak również mają wpływ na uszczelnienie bariery jelitowej [Macpherson i Harris 2004].

2.3. MOŻLIWOŚCI STYMULACJI MIKROBIOMU

Mikroflora przewodu pokarmowego może być modyfikowana poprzez podawanie probiotyków, które zajmą miejsce części obecnych już mikroorganizmów lub prebiotyków, które spowodują zwiększony wzrost tylko wybranej grupy bakterii. Prebiotyki, które są dla probiotyków substancjami odżywczymi, mogą być dostarczane z zewnątrz w postaci cukrów, opornych na działanie enzymów trawiennych przewodu pokarmowego [Alloui i wsp. 2013]. Prebiotyki stanowiące źródło węglowodanów wyłącznie dla wybranych grup mikroorganizmów, stymulują wzrost bakterii probiotycznych takich jak *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* [Patterson i Burkholder 2003]. W badaniach własnych wykorzystano dwa prebiotyki. Jednym z nich jest komercyjny, dostępny na rynku prebiotyków Bi²Tos, galaktooligosacharyd (GOS) syntetyzowany przy pomocy naturalnych enzymów, pochodzących z szczepu *Bifidobacterium bifidum* [Tzortzis i wsp. 2005]. Udowodniono, że GOS selektywnie stymuluje rozwój mikroflory bakteryjnej, wpływając bezpośrednio na wzrost *Bifidobacterium* u kurcząt [Jung i wsp. 2008].

Podawanie synbiotyków kurom nieśnym spowodowało obniżenie cholesterolu i poziomu nasyconych kwasów tłuszczowych w żółtku jaja. Ta sama suplementacja diety synbiotykiem spowodowała podwyższenie poziomu nienasyconych kwasów tłuszczowych [Tang i wsp. 2015]. Yitbarek i współpracownicy wykazali iż dodatek synbiotyków do diety kurcząt broilerów ma korzystny wpływ na układ immunologiczny [Yitbarek i wsp. 2015].

2.3.1. PODAWANIE PREBIOTYKÓW, PROBIOTYKÓW, SYNBIOTYKÓW

2.3.1.1. W paszy i w wodzie

W przypadku zwierząt gospodarskich (jak np. trzoda chlewna, drób), najczęściej stosowaną metodą podawania prebiotyków, probiotyków i synbiotyków jest dostarczanie ich w paszy i w wodzie. Sposób ten jest prosty i wygodny dla hodowców. Wymaga jednak podawania systematycznie dawek substancji bioaktywnych [Timmerman i wsp. 2006; Piray i wsp. 2007]. Kolejną wadą tej metody jest czas działania a mianowicie efekt jest uzyskiwany z opóźnieniem, potrzebny jest czas aby probiotyki wyparły część obecnej mikroflory, a prebiotyki zastymulowały mikroorganizmy probiotyczne do wzmożonego wzrostu. Powstaje więc luka czasowa, od wyklucia do wytworzenia stabilnego mikrobiomu (3-4 dni), w której zwierzęta nie są chronione [Klasing 2007].

2.3.1.2. *In ovo*

W przypadku ptaków, rozwój embrionalny przebiega w jaju, poza organizmem matki. Ta droga rozwoju zarodkowego umożliwia podanie substancji bioaktywnych jeszcze przed wylęgiem. W Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt została opracowana i opatentowana (nr 197726) technologia *in ovo* podawania prebiotyków w 12 dobie rozwoju zarodkowego [Villaluenga i wsp., 2004]. W kolejnych etapach badań technologia ta została również zastosowana w przypadku iniekcji synbiotyków. Podane w ten sposób bakterie probiotyczne jako pierwsze zasiedlają przewód pokarmowy ptaków, przez co nie muszą konkurować z rozwiniętą florą, jak przy podaniu w paszy czy w wodzie. Podanie prebiotyku *in ovo* jest również korzystne, gdyż stymuluje florę endogenną jaja. Dzięki tej technologii pisklę jest chronione przed potencjalnymi patogenami jeszcze przed wylęgiem.

2.4. CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI PROBIOTYCZNYCH MIKROORGANIZMÓW

Mikroorganizmy probiotyczne powinny się przede wszystkim cechować [Patterson i Burkholder 2003]:

- wysoką odpornością na działanie niskiego pH występującego w żołądku oraz enzymów i kwasów żółciowych obecnych w dwunastnicy;
- zdolnością przywierania do komórek nabłonka jelit, która umożliwia kolonizację przewodu pokarmowego;
- korzystnym działaniem na organizm gospodarza, które może objawiać się zwiększonym przyrostem masy ciała, lepszym składem chemicznym mięsa, a także zwiększeniem zdrowotności wynikającej ze stymulacji układu immunologicznego.

Mechanizm oddziaływania probiotyków na układ immunologiczny polega na rozpoznawaniu przez komórki układu immunologicznego wzorców molekularnych związanych z określonymi bakteriami, tzw. MAMPs (ang. *microbe-associated molecular patterns*). Zaliczają się do nich takie części składowe bakterii jak: lipopolisacharydy, lipoproteiny, kwas lipotejchojowy, niemetylowane sekwencje CpG, polisacharydy, peptydoglikany oraz flagellina. MAMPs łączą się z receptorami rozpoznającymi wzorce tzw. PRR (ang. *pattern recognition receptors*), które znajdują się, w zależności od ich rodzaju, na powierzchni lub wewnątrz komórek układu immunologicznego [Gómez-Llorente, Muñoz, i Gil, 2010]. Do grupy PRR należą receptory Toll-podobne (ang. TLRs Toll-like receptors), rozpoznające specyficzne dla siebie antygeny bakteryjne, np.: TLR1 i TLR2 tworzą heterodimer aktywowany przez kwas lipotejchojowy, lipopeptydy oraz peptydoglikan (Farhat i wsp., 2008); TLR4 rozpoznaje LPS [Brubaker, Bonham, Zanoni, i Kagan, 2015]; TLR5 flagellinę [Miao, Andersen-Nissen, Warren, i Aderem, 2007]; TLR21 niemetylowane sekwencje CpG [Brownlie i wsp., 2009]. Po przyłączeniu się antygeny do odpowiedniego receptora PRR następuje aktywacja specyficznych szlaków sygnałowych związanych z układem immunologicznym [Takeda i Akira, 2005]. Bakterie probiotyczne posiadają różne MAMPs, przez co mogą aktywować wiele receptorów TLR [Lebeer i wsp. 2010].

2.4.1. Ocena właściwości *in vitro*

W badaniach *in vitro* dotyczących analizy właściwości immunostymulacyjnych probiotyków często wykorzystywane są linie komórkowe [Pereira i wsp. 2003; Falagas i wsp. 2006]. Linia komórkowa, służąca jako model *in vitro* do oceny właściwości immunostymulacyjnych probiotyków, powinna posiadać wszystkie rodzaje receptorów TLR, aby mogła rozpoznać wszystkie MAMPs wchodzące w skład danej bakterii.

Bakterie probiotyczne, które zostały użyte w doświadczeniu (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus Plantarum* oraz *Lactobacillus salivarius*), należą do grupy Gram-dodatnich bakterii kwasu mlekowego. Bakterie te są nieurzęsione, nie produkują toksyn, ani nie wytwarzają przetrwalników [Madigan, 2012]. Zgodnie z powyższymi danymi literaturowymi, bakterie te aktywują TLR1 i TLR2 poprzez kwas lipoteichojowy, lipopeptydy oraz peptydoglikan, będące składnikami ich ściany komórkowej; TLR4 może zostać aktywowany przez egzopolisacharydy produkowane przez *Lactococcus lactis*. Aktywacji powinien także ulec TLR21 poprzez niemetylowane sekwencje CpG znajdujące się w bakteryjnym DNA. Różnice w budowie ściany komórkowej (grubość, różne lipopeptydy powierzchniowe), różne egzopolisacharydy, specyficzne dla danego szczepu powinny, przyczynić się do powstania specyficznych dla danego szczepu właściwości immunostymulacyjnych. Wynikiem tego typu analiz, wykonywanych w oparciu o linie komórkową, jest określenie zmian w ekspresji genów związanych z układem immunologicznym po ko-stymulacji komórek danej linii z komórkami analizowanych bakterii probiotycznych.

2.4.2. Ocena właściwości *in vivo*

Oddziaływanie probiotycznych bakterii na układ immunologiczny ma szeroki zakres, od: zmiany w rozmiarach i strukturze organów układu immunologicznego [Sławińska i wsp., 2014], przez podwyższeniu poziomu ekspresji cytokin w śledzionie, a obniżeniu w migdałkach jelit ślepych [Sławińska, Siwek, i Bednarczyk, 2014] aż po regulację odpowiedzi pro- i antyzapalnej poprzez zmianę ekspresji IL-10 i IL12 [Ma i wsp. 2015][Kaji i wsp. 2010]. Probiotyki mogą także łagodzić patologiczne stany zapalne, przeciwdziałając uszkodzeniom tkanki jelitowej [Plaza-Diaz i wsp. 2014]. Tak szeroki zakres oddziaływań nie może być oceniony przy pomocy uproszczonego modelu *in vitro*. Zawiera on zazwyczaj tylko jedną homogeną populację komórek, co uniemożliwia zaobserwowanie interakcji między różnymi typami komórkami układu immunologicznego. [Macpherson i Harris 2004; Chung i wsp. 2012; Kuhn i Stappenbeck 2013]. Na przykład, aby w pełni

ocenić wpływ probiotyków na układ immunologiczny jako model nie wystarczy homogenna linia makrofagów, gdyż ich aktywacja w ścianie jelit wymaga obecności komórek dendrytycznych [Shapiro i wsp. 2011]. Dlatego też, probiotyki, które zostały wstępnie wytypowane za pomocą modelu *in vitro*, muszą zostać poddane ocenie *in vivo*. Tylko w ten sposób można uzyskać pełne informacje dotyczące wybranych mikroorganizmów probiotycznych na organizmie gospodarza.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. OCENA WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOSTYMULUJĄCYCH BAKTERII – BADANIA *IN VITRO*

3.1.1. Przygotowanie linii komórkowej

Do oceny właściwości immunostymulujących bakterii wykorzystano model *in vitro* bazujący na kurzej makrofago-podobnej linii komórkowej HD11 [Beug i wsp. 1979]. Komórki były utrzymywane w medium RPMI-1640 (Biological Industries, Beyt Haemek, Israel) z dodatkiem: 10% FBS inaktywowanego termicznie, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 1% pirogronianu sodu, 1% L-glutaminy i 1% roztworu penicyliny-streptomycyny (GIBCO, Grand Island, NY). Linia komórkowa była inkubowana w butelkach do hodowli tkankowej o powierzchni 75 cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) w atmosferze zawierającej 5% CO₂ w temperaturze 41.5°C. Linia HD11 jest adherentna, dlatego procedura pasażowania obejmowała etap odklejania komórek od powierzchni butelki. W tym celu po usunięciu medium, komórki były przepłukane roztworem PBS, a następnie traktowane 3ml 0.25% roztworu trypsyny (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). Po 5 min inkubacji w temperaturze 41.5°C, do hodowli komórkowej dodano 5 ml świeżego medium i połączono z wcześniej zebrany starym medium. Medium zostało usunięte poprzez wirowanie, a osad komórek został zawieszony w świeżym medium w koncentracji 0.5 x 10⁶ komórek/ml. Procedura pasażowania była przeprowadzana co 48 godzin.

16 godzin przed planowaną stymulacją, linię komórkową HD11 zawieszano w medium o obniżonej zawartości surowicy (medium RPMI-1640 suplementowane 1% FBS i 1% L-glutaminy) w koncentracji 1.25 x 10⁶ komórek/ml. Tak przygotowana linia komórkowa była umieszczana na płytkach 6-dółkowych w objętości 2ml/dółek. Inkubacja płytek hodowlanych prowadzona była przez całą noc.

3.1.2. Przygotowanie probiotyków do stymulacji linii komórkowej

Do stymulacji linii komórkowej HD11 zastosowano cztery szczepy probiotyczne: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036 (**P3**) oraz *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**), które zostały dostarczone przez Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Warszawa). Wszystkie szczepy bakteryjne były przechowywane w temperaturze -80°C w medium

z dodatkiem glicerolu. Pierwszym etapem przygotowania kultur bakteryjnych był posiew redukcyjny na płytki zawierające agar M17 (BTL, Łódź, Poland), dla bakterii z rodzaju *Lactococcus*, oraz płytki z agarem MRS (BTL, Łódź, Poland), dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Kolonie bakteryjne były inkubowane w 28°C w warunkach tlenowych (*Lactococcus*) lub beztlenowych (*Lactobacillus*). Po 48 godzinach specyficzne dla bakterii kolonie (gładkie, matowe o kremowym zabarwieniu) zostały przeniesione do płynnego medium M17 (*Lactococcus*) lub MRS (*Lactobacillus*). Po całonocnej inkubacji w 28°C bakterie zostały trzykrotnie przepłukane w PBS, a na koniec zawieszone w świeżej porcji PBS. Dla tak przygotowanych zawiesin bakterii została zmierzona absorbancja przy długości fali 595nm z wykorzystaniem Biophotometeru Plus (Eppendorf AG, Hamburg, German). Zebrane informacje dotyczące absorbancji posłużyły do obliczenia liczby bakterii w jednym ml według wzoru:

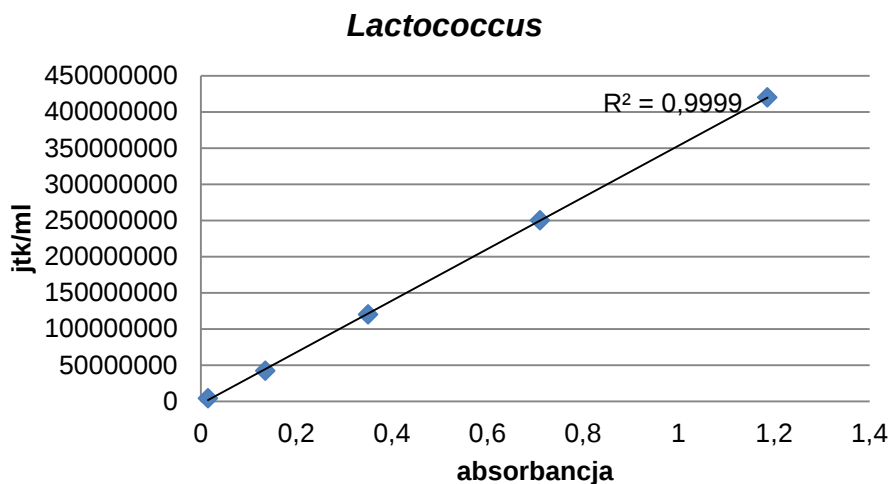
Liczba bakterii/ml = $356879291.25 \cdot A - 3530244.37$ (dla *Lactococcus*)

Liczba bakterii/ml = $383333333.33 \cdot A - 4666666.67$ (dla *Lactobacillus*)

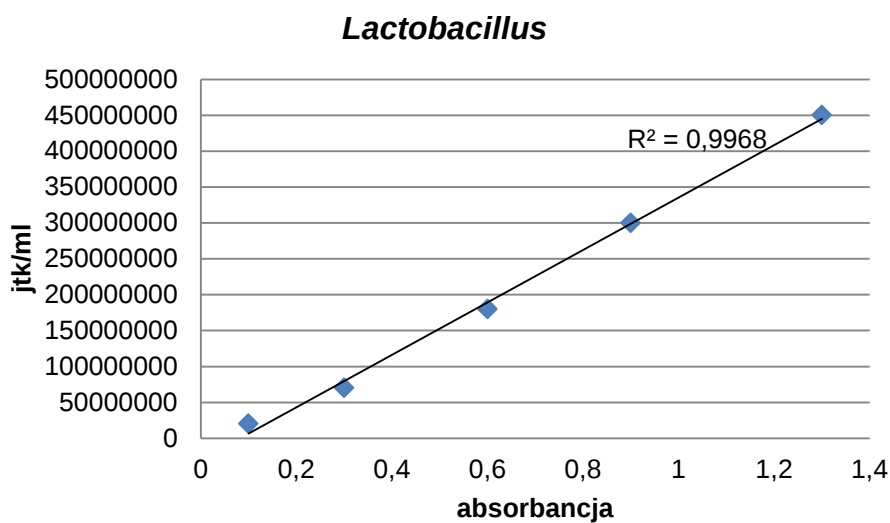
Gdzie A to absorbancja.

Powyższe wzory zostały opracowane na podstawie funkcji zależności absorbancji od liczby bakterii, która została opracowana doświadczalnie (figura 1 i 2). W tym celu dla kolejnych rozcieńczeń bakterii wykonano pomiar absorbancji, a następnie policzono liczbę bakterii metodą posiewu wgłębnego. Wyniki zestawiono w Excelu i wyprowadzono wzór dla funkcji liczby bakterii od absorbancji.

Przed stymulacją przygotowano zawiesinę bakterii o koncentracji $2,5 \cdot 10^8$ bakterii na 1 ml.



Rys. 1. Wykres zależności absorbancji (OD600) od liczby bakterii *Lactococcus*. Jtk – jednostki tworzące kolonie



Rys. 2. Wykres zależności absorbancji (OD600) od liczby bakterii *Lactobacillus*. Jtk – jednostki tworzące kolonie

3.1.3. Oznaczenie poziomu ekspresji receptorów Toll-podobnych w linii komórkowej - RT-qPCR

W celu oceny zdolności linii HD11 do rozpoznawania antygenów występujących u bakterii, sprawdzono ekspresję receptorów Toll-podobnych (*TLR1A*, *TLR1B*, *TLR2A*, *TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *TLR21*) wykorzystując ilościową łańcuchową reakcję polimerazy DNA poprzedzoną odwrotną transkrypcją (RT-qPCR). W tym celu całkowite RNA, pochodzące z niestymulowanej linii komórkowej HD11, wyizolowane i oczyszczone przy pomocy Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland), zostało przekształcone w cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific/Fermentas, Vilnius, Lithuania). Następnie przeprowadzona została reakcja qPCR, przygotowana w objętości 10 µL mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 5 µL Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific/Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 µM starterów forward i reverse oraz 140 ng wcześniej przygotowanego cDNA. Dodatkowo sprawdzona została ekspresja genu konstytutywnego: dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (*G6PDH*) [Sevane i wsp. 2014], która w dalszych etapach analiz była wykorzystana do porównania z ekspresją TLR. Oligonukleotydowe sekwencje starterów dla TLR (Tabela 1), zostały zaprojektowane w NCBI/Primer-BLAST [Ye i wsp. 2012], w taki sposób, aby obejmowały miejsce łączenia dwóch egzonów. Reakcja qPCR prowadzona była w urządzeniu LightCycler 480 System (Roche-Diagnostics, Basel, Switzerland). Program termiczny składał się z trzech etapów: (1) wstępnej denaturacji w 95°C przez 15 min, (2) 40-stu cykli amplifikacji (denaturacja w 95°C przez 15 s, przyłączanie starterów w 58°C przez 20 s, synteza nici komplementarnej w 72°C przez 20s) oraz (3) stworzenie krzywej topnienia. Fluorescencja była mierzona na końcu każdego etapu syntezy nici komplementarnej. Krzywa topnienia została wygenerowana poprzez podnoszenie temperatury z 65°C do 98°C i mierzeniu spadku fluorescencji podczas denaturacji produktów reakcji. Poziom ekspresji genów TLR i *G6PDH* został zaprezentowany jako wynik równania 40 – średnie Ct.

Tabela 1. Sekwencje starterów wykorzystanych do analizy TLR

Gen	NCBI Gene ID	Sekwencje starterów (5'→3')
<i>ACTB</i>	L08165	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT
		R: CATCACAATACCAGTGGTACG
<i>G6PDH</i>	AI981686	F: CGGGAACCAAATGCACTTCGT
		R: GGCTGCCGTAGAGGTATGGGA
<i>TLR1A</i>	NM_001007488.4	F: TCAATCCATAAAAAGGTTGGACTTCT
		R: AGGGATCCCATTATGTGTCTCA
<i>TLR1B</i>	NM_001081709.3	F: CCGTGGAGTGATGTCCCAAA
		R: CAAGGTGGAGGAGGGAGTTT
<i>TLR2A</i>	NM_204278.1	F: TTTGCGTTGCTGGAGCATAA
		R: AGCCAGTTCTCATCAGGCATA
<i>TLR2B</i>	NM_001161650.1	F: CCTGAAGCCACAGACATTCC
		R: ACTGTCAGCTCTTCCTTGGAG
<i>TLR3</i>	NM_001011691.3	F: CCCCTGAAAGAGTTTCACACA
		R: TGGCTCAGTGAGAGGTTCTG
<i>TLR4</i>	NM_001030693.1	F: TGAAATCCCAAACACCACCC
		R: TTGTATGGATGTGGCACCTTG
<i>TLR5</i>	NM_001024586.1	F: TCCACCTGCAGCAGATACAA
		R: AGGAATTCTGGACCCACTCG
<i>TLR7</i>	NM_001011688.2	F: CACACCGGAAAATGGTACATCA
		R: TTTGGGAAACCAACGTCCTG
<i>TLR15</i>	NM_001037835.1	F: CATTAGCGACAACGCCATCA
		R: CAAATGCGGGTTACGGATGT
<i>TLR21</i>	NM_001030558.1	F: CACCTGACACAGCTGCATAC
		R: GAACACCCCTTCAGCAAGTG

Sekwencje zostały zaprojektowane dla genów zdeponowanych w NCBI z wykorzystaniem narzędzia PickPrimers (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

3.1.4. Stymulacja linii komórkowej, izolacja i ocena RNA

Do przygotowanej 16 godzin wcześniej, hodowli HD11 na płytkach 6-dółkowych, dodano 100µl na dółek jednej z czterech wcześniej przygotowanych zawiesin bakteryjnych w grupach eksperymentalnych oraz 100µl na dółek PBS dla grupy kontrolnej. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych (trzy dołki na grupę). Po sześciu godzinach inkubacji w 5% CO₂ i 41.5°C całkowite RNA zostało wyizolowane i oczyszczone przy pomocy Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland) oraz DNAzy (EURx, Gdańsk, Poland), zgodnie z instrukcją producenta. Wszystkie próby RNA zostały ocenione pod względem koncentracji i czystości z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Nanodrop Products, Wilmington, USA). Stopień degradacji został oceniony poprzez naniesienie 5µl próby na 1,5% żel agarozowy zawierający 5µl barwnika interkalującego SimplySafe (EURx, Gdańsk, Poland) na 100ml żelu. Następnie przez 45 minut prowadzono elektroforezę, po której wykonano zdjęcie żelu w G:BOX EF2 (Syngene, Leusden, Netherlands). Tylko próby, w których były widoczne dwa wyraźne prążki wykorzystano do dalszych analiz. Tak przygotowane próby zamrożono i przechowywano w -20°C przed rozpoczęciem dalszych analiz.

3.1.5. Analiza transkryptomu linii komórkowej po stymulacji probiotykami – całogenomowa mikromacierz ekspresyjna

W celu sprawdzenia jak stymulacja probiotykami wpłynęła na transkryptom linii HD11, wykonano analizę z wykorzystaniem całogenomowej mikromacierzy ekspresyjnej - Chicken Gene 1.1 ST Array Strip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). W pierwszym etapie, 100 ng całkowitego RNA zostało przekształcone do jednoniciowego cDNA przy użyciu Ambion WT Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Następnie, jednoniciowe cDNA zostało pocięte i wyznakowane przy pomocy GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Na koniec, pocięte i wyznakowane jednoniciowe cDNA poddano hybrydyzacji do Chicken Gene 1.1 ST Array Strip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) przez 20 godzin. Mikromacierze zostały wypłukane i przeskanowane za pomocą GeneAtlas® System (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Wyniki skanowania mikromacierzy, w postaci plików CEL, zostały wykorzystane do stworzenia HeatMap (Hierarchical Cluster Tree) oraz do stworzenia listy genów o zmienionej ekspresji (ang. DEG – *differentially expressed genes*).

W celu przygotowania HeatMap, pliki CEL zostały najpierw znormalizowane przy użyciu funkcji „*Gene Level-Default:RMA-Sketch*” w programie Expression Console (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Znormalizowane dane zostały następnie wyeksportowane do pliku tekstowego z użyciem opcji „*Export Probe Set Results (pivot table) with Annotation to TXT*”. Z listy usunięto geny o nieznanym nazwie. Tak przygotowany plik zaimportowano do programu Multiexperiment Viewer version (MeV) 4.9 [Saeed i wsp. 2003]. Wygenerowano listę genów, których ekspresja różni się istotnie statystycznie między grupami z użyciem funkcji: „*Significance Analysis for Microarrays*”. Statystycznie istotne wyniki zostały następnie grupowane przy wykorzystaniu funkcji: „*Hierarchical Clustering*” w celu wygenerowania HeatMap.

Znormalizowane dane posłużyły, także, do skonstruowania listy DEG przy użyciu programu Transcriptome Analysis Console v3.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) i funkcji „*Gene Level Differential Expression Analysis*”. Program oszacował istotność różnic pomiędzy grupą kontrolną, a każdą z grup doświadczalnych (P1, P2, P3, P4) dla danego genu. Za zmiany istotne statystycznie uznano takie o: $p\text{-value} \leq 0.05$ i $FDR \leq 0.05$. Z listy usunięto geny o fold change (FC, z ang. krotność zmian) ≤ 1.75 oraz ≥ -1.75 . Narzędzie DAVID Gene Functional Classification Tool [Huang, Lempicki, i wsp. 2009] [Huang, Sherman, i wsp. 2009] zostało wykorzystane do selekcji genów związanych z układem, dla których sprawdzono w jakich szlakach biologicznych biorą udział. Do porównania list DEG dla wszystkich eksperymentalnych grup, wykorzystano diagramy Venna wygenerowanych w Venny [Oliveros 2007].

3.1.6. Walidacja wyników mikromacierzy za pomocą RT-qPCR

W celu sprawdzenia wiarygodności wyników z mikromacierzy, dla 5 genów o podwyższonej ekspresji (*INHBA*, *TNFAIP6*, *ITGB3*, *HAS2*, *PRKCI*) i 5 o obniżonej (*DPP7*, *MCM5*, *SLC1A6*, *FGL2*, *FUT7*) przeprowadzono reakcję RT-qPCR. Warunki reakcji i skład mieszaniny reakcyjnej został opisany w Rozdziale 3.1.4. Normalizacja poziomu ekspresji genów została przeprowadzona z *G6PDH* jako genem referencyjnym. Względna analiza ekspresji została obliczona z użyciem algorytmu $\Delta\Delta C_t$, dla którego wzrost ekspresji genu docelowego jest liczony według formuły $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [Livak i Schmittgen 2001]. Do obliczenia istotności różnic między grupą kontrolną, a grupą doświadczalną dla każdego z genów, wykorzystano test t-Studenta. Dla wyników z mikromacierzy i RT-qPCR obliczono współczynnik korelacji w Microsoft Excel.

Tabela 2. Sekwencje starterów wykorzystanych do walidacji mikromacierzy

Gen	NCBI Gene ID	Sekwencje starterów (5'→3')
<i>ACTB</i>	L08165	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT
		R: CATCACAATACCAGTGGTACG
<i>G6PDH</i>	AI981686	F: CGGGAACCAAATGCACTTCGT
		R: GGCTGCCGTAGAGGTATGGGA
<i>INHBA</i>	NM_205396.1	F: TGCAGAATCAGGAACACCCA
		R: TGACTTTTGTCTCTGCTCCG
<i>TNFAIP6</i>	NM_001037837.2	F: ATGGTTTTGTGGGCAGGTTC
		R: TTGGAAGGCACGTCTATCGT
<i>ITGB3</i>	NM_204315.1	F: GTTCGGAGGAGGAGATGGAG
		R: CGCAGATGTTACTCCCCCA
<i>HAS2</i>	NM_204806.2	F: AGGCGATGTGCAGATTTTGA
		R: TAGGACTGGCAGGCTCTTTC
<i>PRKCI</i>	NM_001031319.1	F: AGGAGAAGATACGAGCTCACTG
		R: CATTTGTATCCCTGGCGACC
<i>DPP7</i>	XM_415570.5	F: TGTTCTGAGCGGAGCTTAT
		R: GGCAATCATGGTGAAGGCAT
<i>MCM5</i>	NM_001006243.1	F: ATGCCTACCATCCTGTCTCG
		R: CCAACGTCATGTCTCGTTCC
<i>SLC1A6</i>	XM_004948655.2	F: GGCCATTATCATCTGGTACGC
		R: TGAATGAGGAGCCCAACGAT
<i>FGL2</i>	NM_001079486.1	F: GCAGCCAAGCCCTGTTATTC
		R: TTTCTGGGGTCAGGGGTAAC
<i>FUT7</i>	XM_015279614.1	R: TCCCTTTCACGGGAGCC
		GCAGTTACCACTGCCTTCAC

Sekwencje zostały zaprojektowane dla genów zdeponowanych w NCBI z wykorzystaniem narzędzia PickPrimers (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

3.2. TEST PRZENIKANIA PREBIOTYKÓW I PROBIOTYKÓW PODANYCH *IN OVO*

3.2.1. Przygotowanie barwnika i probiotyku

Do symulacji przenikania prebiotyku przez błonę podskorupową wykorzystano indygokarmin, który został rozpuszczony w PBS w koncentracji 0,1g/ml. Do każdego zarodka podano 0,2 ml tak przygotowanego roztworu. Zawiesina bakterii *L. lactis* IBB477 została przygotowana zgodnie z opisem w rozdziale: 3.1.2. w rozcieńczeniu 5000 jtk/ml, którego podano 0,2 ml na jeden zarodek (1000 jtk/jajo).

3.2.2. Iniekcja *in ovo*

Do jaj w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego, za pomocą insulinówki, podano do komory powietrznej 200µl roztworu barwnika lub zawiesiny bakterii. Otwór powstały po iniekcji zaklejono klejem spożywczym. Jaja ponownie inkubowano w 38°C przy wilgotności 65-70%. Doświadczenie związane z przenikaniem prebiotyku i probiotyku, przeprowadzono w trzech powórzeniach biologicznych, w których łącznie wykorzystano 48 jaj.

3.2.3. Ocena przenikania barwnika z komory powietrznej do wnętrza jaja

W kolejnych dniach po iniekcji (od 1-szego do 7-go) rozcinano jaja wzdłuż krótkiej osi, tak aby nie uszkodzić komory powietrznej. Zarodek po wyjęciu ze skorupy był poddany dekapitacji. Następnie na białym papierze rozkładano fragment błony kosmówkowej stykającej się z komorą powietrzną. Fotografowano tak przygotowane części jaja, aby sprawdzić do jakich struktur przeniknął barwnik danego dnia.

3.2.4. Wykrywanie bakterii w błonie podskorupowej, płynie owodniowym i przewodzie pokarmowym

Jaja i zarodki traktowane były jak opisano w Rozdziale 3.2.3. Do dalszych analiz pobierano 1ml płynu owodniowego, fragment błony podskorupowej tworzącej komorę powietrzną oraz fragment błony kosmówkowej. Pozyskany materiał biologiczny był umieszczany w 5ml płynnej pożywki M17 zawierającej tetracyklinę. Zastosowane medium jest selektywnie namnażające dla bakterii z rodzaju *Lactococcus*, ponadto szczep IBB477 jest odporny na tetracyklinę, przez co ewentualny wzrost bakterii w medium był spowodowany jedynie podanym probiotykiem. W 20-stej dobie rozwoju embrionalnego pobrano dodatkowo fragmenty jelit. Podłoża z próbkami inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 28°C. Obecność bakterii w danej próbce oznaczało zmętnienie medium spowodowane przez wzrost bakterii. Dla prób, w których zaobserwowano zmętnienie, przeprowadzono posiew redukcyjny eż na podłoże stałe M17, które następnie inkubowano przez 48 godzin. W ten sposób otrzymano pojedyncze kolonie, dzięki czemu można było ocenić, czy w próbce znajdują się tylko bakterie z rodzaju *Lactococcus*.

3.3. OCENA WPŁYWU PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW PODANYCH *IN OVO* NA TRANSKRYPTOM KURY

3.3.1. Iniekcja *in ovo* prebiotyku i synbiotyku

Jaja wylęgowe w ilości 300 (30 jaj na grupę) pochodziły od 32-tygodniowych kur. W doświadczeniu nałożono łącznie 9000 jaj. W dwunastej dobie jaja zostały prześwietlone, jaja z zmarłymi zarodkami zostały odrzucone, a pozostałe jaja podzielono losowo na 5 grup. Wszystkie jaja wykorzystane w doświadczeniu pochodziły z tej samej farmy i miały podobną wagę – około 60g. Inkubacja jaj była prowadzona przez P.D. Drobex Sp. z o.o. w Solcu Kujawskim w automatycznym inkubatorze w 37.8°C i względnej wilgotności 61%-63%. W czasie inkubacji jaja były świetlone zgodnie z procedurą firmy Drobex. W dwunastej dobie rozwoju embrionalnego do komory powietrznej jaj (Ross 308) za pomocą automatycznego systemu do iniekcji podano 200µl roztworu zawierającego substancje bioaktywne. Układ grup doświadczalnych oraz zastosowane prebiotyki i synbiotyki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Układ grup doświadczalnych w doświadczeniu *in ovo*

nr	Nazwa grupy	Symbol grupy	Substancja	Dawka
1	Grupa kontrolna	K	PBS	
2	Prebiotyk 1	P1	Inulina	1,76 mg
3	Prebiotyk 2	P2	GOS	0,528 mg
4	Synbiotyk 1	S1	Inulina + <i>L lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IBB2955	1,76 mg +1000jtk
5	Synbiotyk 2	S2	GOS + <i>L lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IBB477	0,528 mg +1000jtk

Inulina (Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Germany), GOS (Clasado Biosciences Ltd., Jersey, UK), jtk – jednostki tworzące kolonie

Prebiotyki były rozpuszczone w PBS, natomiast bakterie były przygotowane według punktu: 3.1.2. Przygotowanie probiotyków do stymulacji linii komórkowej.

3.3.2. Odchów i pobieranie prób

Po wykluciu pisklęta zostały poddane seksowaniu, a następnie wybrano łącznie 3 325 kogutków Ross 308 o masie około 42g do dalszego odchowu. Ptaki utrzymywano na ściółce i żywiono *ad libitum* zgodnie z trzy-fazowym programem żywienia dla broilerów Ross. Zwierzęta były karmione standardowymi paszami handlowymi otrzymanymi z Agrocentrum (Kałęczyn): starter (dzień 1 do 14), grower (dzień 15 do 30) i finisz (dzień 31 do 34). Szczegółowy skład pasz przedstawiono w Tabeli 3. W 1-szym, 14-stym i 35-tym dniu życia pobrano od pięciu osobników z każdej grupy: śledzionę, migdałki jelit ślepych i fragment jelita grubego. Próbkę natychmiast zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C. Wszystkie procedury stosowane w doświadczeniu zostały zatwierdzone przez lokalną komisję etyczną (Nr 22/2012. 21.06.2012) i były zgodne z zaleceniami w zakresie dobrostanu zwierząt w Unii Europejskiej (dyrektywa 86/609/EEC).

Tabela 4. Składniki paszy w gramach na kg mieszanki

	Starter	Grower	Finisz
	1 do 14 d	15 do 30 d	31 do 34 d
Składnik			
Pszenica	267.3	291.9	306.6
Kukurydza	300.0	300.0	300.0
Śruta sojowa	325.0	282.0	253.3
Rzepak	50.0	60.0	70.0
Olej sojowy	21.0	13.3	18.0
Smalec	-	20.0	25.0
Sól	3.0	3.0	2.8
Wapień	10.9	9.5	8.5
Fosforan monokapniowy	11.5	9.4	6.3
DL-Metionina 99	2.5	1.8	1.3
L-lizyna 78	3.2	3.2	2.7
L-treonina	0.6	0.9	0.5
Premiks witaminowo-mineralny ¹	5.0	5.0	5.0
Obliczony poziom składników odżywczych ²			
AME, kcal/kg	2,980	3,100	3,200
CP	220.0	205.0	195.0
Tłuszcz surowy	60.9	77.0	90.4
Lizyna	13.5	12.5	11.5
Metionina + cysteina	9.5	8.5	7.8
Wapń	9.0	8.0	7.0
Dostępny P	4.0	3.5	2.8
Na	1.4	1.4	1.3

¹Suplementacja na 1kg paszy: witamina A 12,500 IU, witamina D₃ 4,500 IU, witamina E 45 mg, witamina K₃ 3 mg, witamina B₁ 3 mg, witamina B₂ 6 mg, witamina B₆ 4 mg, kwas pantotenowy 14 mg, kwas nikotynowy 50 mg, kwas foliowy 1.75 mg, cholina 1.6 g, witamina B₁₂ 0.02 mg, biotyna 0.2 mg, Fe 50 mg, Mn 120 mg, Zn 100 mg, Cu 15 mg, I 1.2 mg, Se 0.3 mg, fitaza 500 FTU, diklazurol 1 mg (tylko w mieszance starter i grower).

² Oszacowanie na podstawie polskich tabel analizy pasz (Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz - normy żywienia drobiu, pod red. S. Smulikowskiej i A. Rutkowskiego. Wyd. IV zmien.i uzupeł. IFiZZ PAN, Jabłonna, 2005. S.Smulikowska – red. całości opracowania).

3.3.3. Analizy molekularne

3.3.3.1. Analiza Punktu czasowego – RT-qPCR

W celu sprawdzenia w jaki sposób zmienia się ekspresja genów związanych z układem immunologiczny po podaniu *in ovo* prebiotyków i synbiotyków, a także wytypowaniu punktu czasowego do wykonania mikromacierzy ekspresyjnej, została przeprowadzona analiza ekspresji genów metodą RT-qPCR zgodnie z punktem: 3.1.6. Analizy przeprowadzono dla pięciu osobników z grup **P1**, **S1** i grupy kontrolnej w każdym z trzech punktów czasowych (dzień 1, dzień 14, dzień 35) dla każdej z dwóch tkanek (migdałki jelit ślepych, śledziona). Analizie ekspresji poddano panel genów związany z układem immunologicznym: IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-18, CD80, IFN- β i IFN- γ (sekwencja starterów zgodnie ze Sławińska i wsp., 2014).

3.3.3.2. Całogenomowa mikromacierz ekspresyjna

W celu oceny zmian w transkryptomie dorosłych kurcząt broilerów we wszystkich grupach doświadczalnych (**P1**, **P2**, **S1**, **S2**, **K**) wykonana została całogenomowa mikromacierz ekspresyjna, zgodnie z punktem: 3.1.5. Analizie poddano trzy tkanki (migdałki jelit ślepych, śledziona, jelito grube) pobrane w 35 dniu życia od 5 osobników dla każdej z pięciu grup doświadczalnych (**P1**, **P2**, **S1**, **S2**, **K**).

3.3.3.3. Analiza wyników mikromacierzy

Dla P2 w migdałkach jelit ślepych, uzyskane anotacje w programie DAVID, zostały skategoryzowane za pomocą narzędzie CateGORizer (<https://www.animalgenome.org/bioinfo/tools/countgo/>). Analiza ta została przeprowadzona tylko w obrębie jednej grupy ze względu na wymagania metodyczne oprogramowania związane z liczbą genów.

3.3.3.4. Walidacja wyników mikromacierzy przy pomocy RT-qPCR

W celu potwierdzenia wiarygodności wyników z mikromacierzy ekspresyjnej, została sprawdzona ekspresja 10 genów (*SLC6A18*, *CD1B*, *LGALS3*, *PAPOLA*, *SYK*, *TLR7*, *NFATC1*, *CD36*, *GP9*, *SERPINB12*) za pomocą RT-qPCR, zgodnie z punktem: 3.1.6. Sekwencje starterów stosowane w reakcji RT-qPCR są podane w Tabeli 3. Walidację wyników mikromacierzy przeprowadzono w śledzionie i migdałkach jelit ślepych z grupy P2. Analizy były wykonane dla pięciu powtórzeń biologicznych.

Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystanych do walidacji mikromacierzy

Gen	NCBI Gene ID	Sekwencje starterów (5'→3')
<i>ACTB</i>	L08165	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT
		R: CATCACAATACCAAGTGGTACG
<i>G6PDH</i>	AI981686	F: CGGGAACCAAATGCACTTCGT
		R: GGCTGCCGTAGAGGTATGGGA
<i>SLC6A18</i>	XM_003640787.2	F: GATACATGGAGGCGGGACAT
		R: AGGCACTGTCTAGAGCAAG
<i>CD1B</i>	NM_001024582.1	F: GTGGAGACGCAGGAAACAC
		R: CATCAGTGCAGCTGGCTTAG
<i>LGALS3</i>	NM_001302800.1	F: AAAGTCCCCTACGATCTGCC
		R: TCCAGTGAAAACCTGTTGGGA
<i>PAPOLA</i>	NM_001198601.1	F: TGCTGATATCGATGCCCTGT
		R: AGCTTCTTCAACAGCCCTCA
<i>SYK</i>	NM_001031430.1	F: GTCTAGCTCGGGTACAGCTC
		R: ATGTTTAATGCCGCTGCCG
<i>TLR7</i>	NM_001011688.2	F: CACACCGGAAAATGGTACATCA
		R: TTTGGGAAACCAACGTCCTG
<i>NFATC1</i>	XM_004935095.1	F: ACAGTCACCTCGGACTTCAG
		R: ATGATTTCGTTTACTGCGGCT
<i>CD36</i>	NM_001030731.1	F: GTCACCCTCCATACAGCTTCT
		R: ACAGGGTGCAGACAGGAAAT
<i>GP9</i>	XM_414314.3	F: AGGGGGAAAATAAAGCTAAAGCA
		R: ATCTGCAAGCCCTTCGTTTC
<i>SERPINB12</i>	XM_414314.3	F: CCCTTACGCTCAGAAGTTGC
		R: TTCAGTCTGTTCCAGCCCA

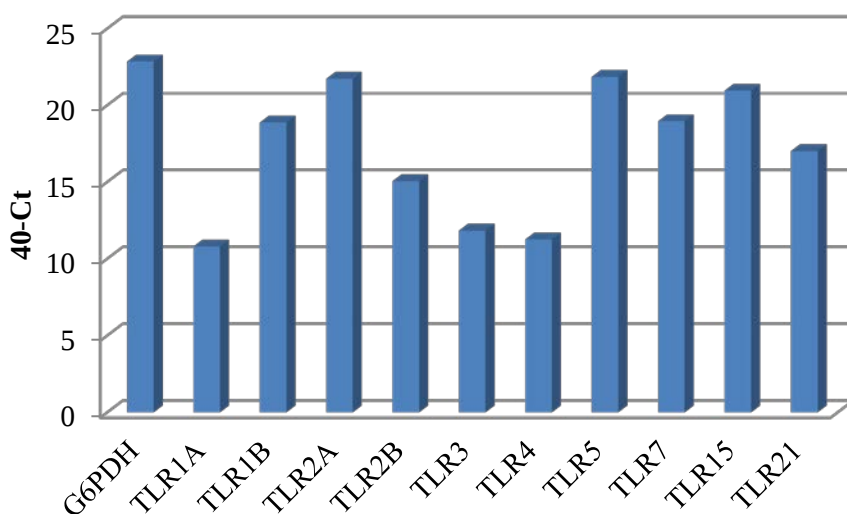
Sekwencje zostały zaprojektowane dla genów zdeponowanych w NCBI z wykorzystaniem narzędzia PickPrimers (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

4. WYNIKI

4.1. OCENA WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOSTYMULUJĄCYCH BAKTERII NA MODELU IN VITRO

4.1.1. Charakterystyka receptorów linii komórkowej HD11

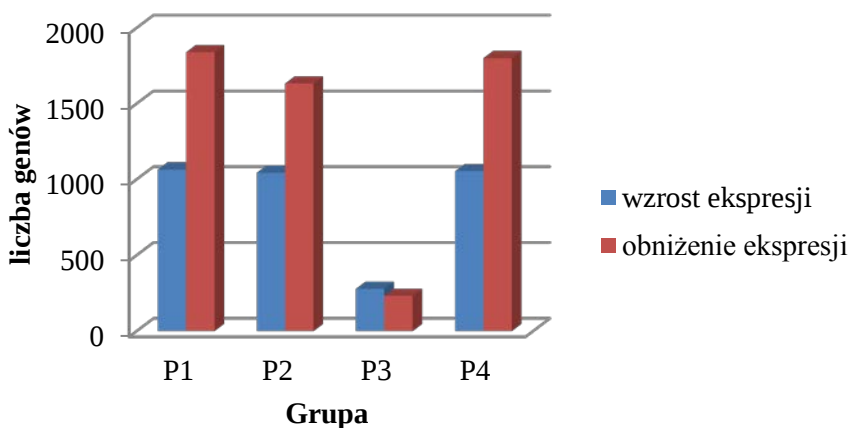
W celu sprawdzenia przydatności linii komórkowej HD11, jako modelu *in vitro*, do oceny właściwości immunostymulujących probiotyków, oznaczony został poziom ekspresji receptorów Toll-podobnych. Analizy wykazały zmiany w ekspresji wszystkich znanych kurzych TLR (Rys. 3). Wyższe słupki na wykresie oznaczają wyższą ekspresję danego genu. Dodatkowo uwzględniona została ekspresja genu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (gen o stałej ekspresji, używany jako gen referencyjny w qPCR). Najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano dla genów: *TLR2A*, *TLR5*, *TLR15*, *TLR7*, *TLR1B*, a najniższy dla: *TLR1B*, *TLR4* i *TLR3*.



Rys. 3. Poziom ekspresji receptorów Toll-podobnych (*TLR1A*, *TLR1B*, *TLR2A*, *TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *TLR21*) w linii komórkowej HD11. Reakcja RT-qPCR została przeprowadzona z użyciem Maxima First Strand cDNA Synthesis kit oraz Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix w termocyklerze LightCycler 480 System. Wynik przedstawiono jako 40-Ct

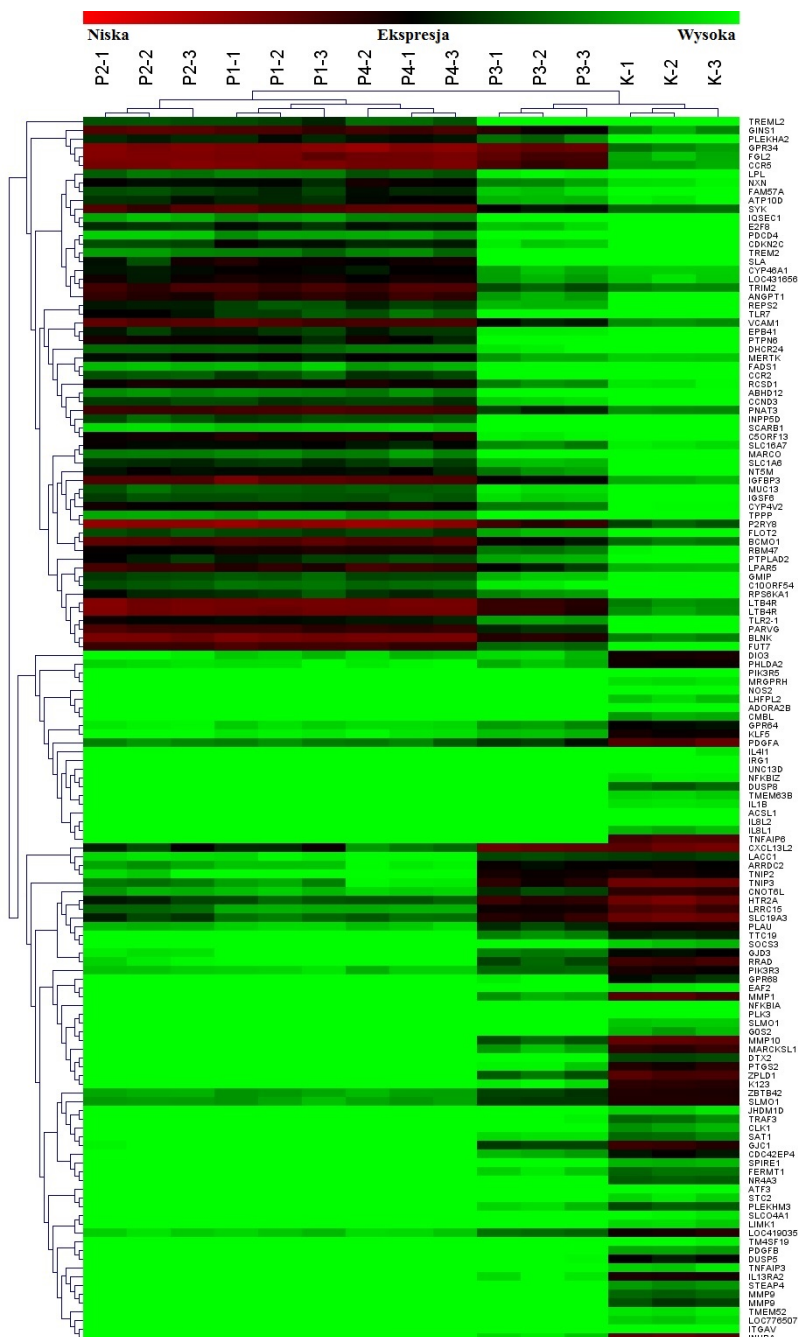
4.1.2. Ilościowa charakterystyka zmian w transkryptomie linii HD11

Po stymulacji linii komórkowej HD11 probiotykami, ekspresja wielu genów uległa zmianie (Rys. 4). Największe zmiany w ekspresji genów zaobserwowano dla trzech grup doświadczalnych: P1 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477), P2 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955) i P4 (*Lactobacillus salivarius* IBB 3154). We wszystkich tych grupach odnotowano wzrost ekspresji około 1000 genów i obniżenie ekspresji dla około 1700 genów. W grupie P3 (*Lactobacillus Plantarum* IBB 3036) wpływ bakterii na ekspresję genów był słabszy: 279 genów miało podwyższoną a 232 obniżoną ekspresję.



Rys. 4. Liczba genów o zmienionej ekspresji w linii komórkowej HD11 po stymulacji probiotykami. Dane zostały wygenerowane przy użyciu GeneChip 1.1 ST microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) z uwzględnieniem $P < 0,05$ i $-2 > FC > 2$. **P1** - *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477, **P2** - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955, **P3** - *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036, **P4** - *Lactobacillus salivarius* IBB 3154

Hierarchicznie zgrupowane geny w postaci *HeatMap* zostały przedstawione na Rys. 5. Próby z grup doświadczalnych P1, P2 i P4 zostały zgrupowane razem, ponieważ charakteryzują się podobnymi wzorcami ekspresji genów. We wszystkich trzech grupach jest więcej genów o podwyższonej ekspresji, a mniej o obniżonej ekspresji. Próby z grupy P3 zostały zgrupowane razem z próbami z grupy kontrolnej, gdyż mimo iż zmianie ekspresji uległo wiele genów, to siła tych zmian była wielokrotnie mniejsza w stosunku do prób z grup P1, P2 i P4. Wskazuje to na duże podobieństwo we wzorcach ekspresji genów po stymulacji probiotykami dla grup P1, P2 i P4 i różnym wzorcem ekspresji w grupie P3.

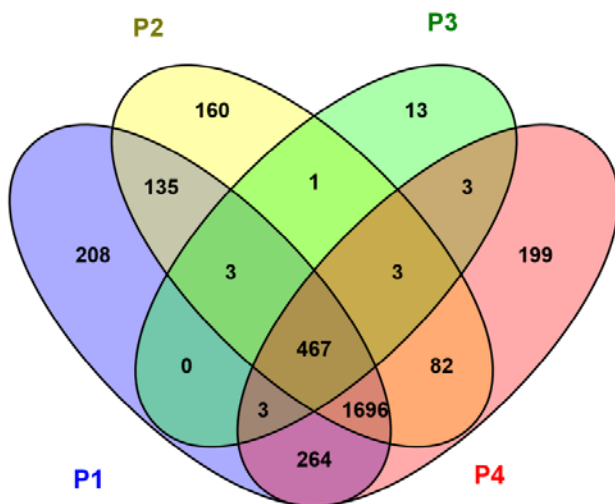


Rys. 5. Heat Map - hierarchicznie zgrupowane sygnatury ekspresji genów w linii komórek HD11 po stymulacji bakteriami probiotycznymi. Do budowy heat map wykorzystano Multiexperiment Viewer w wersji 4.9 (MeV). Linia komórkowa

HD11 została stymulowana *in vitro* bakteriami probiotycznymi: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus plantarum* IBB 3036 (**P3**) lub *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). Ekspresja genów została oznaczona za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) z uwzględnieniem $P < 0,05$ i $-2 > FC > 2$

4.1.3. Funkcjonalna analiza zmian w transkryptomie linii HD11

W każdej grupie doświadczalnej zaobserwowano geny o zmienionej ekspresji właściwe tylko dla danej grupy doświadczalnej (Rys. 6). W grupach P1, P2 i P4 liczba genów o zmienionej ekspresji właściwych dla grupy wynosiła odpowiednio 208, 160, 199. Liczba genów specyficznych dla grupy wynosi 208 dla P1, 160 dla P2 i 199 dla P4. Natomiast w grupie P3 odnotowano jedynie 13 genów specyficznych. 1696 genów o zmienionej ekspresji jest wspólna dla grup P1, P2 i P4. 467 genów o zmienionej ekspresji było wspólnych dla wszystkich czterech grup doświadczalnych.



Rys. 6. Diagramy Venna przedstawiające geny o zmienionej ekspresji wspólne i specyficzne w obrębie grup. Linia komórkowa HD11 została stymulowana *in vitro* bakteriami probiotycznymi: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus plantarum* IBB 3036 (**P3**) lub *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). Ekspresja genów została oznaczona za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) z uwzględnieniem $P < 0,05$ i $-2 > FC > 2$. Diagramy skonstruowano za pomocą Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)

Kolejny etapem analiz było pogrupowanie genów o zmienionej ekspresji (DEG) w zależności od procesów biologicznych w jakich biorą udział. Wygenerowane anotacje GO procesów biologicznych zostały zaprezentowane w Tabeli 5. Procesy wspólne dla wszystkich grup doświadczalnych to: reakcja na bodziec, regulacja biologiczna, lokomocja, procesy układu immunologicznego. Dla grupy P1 i P4 wspólne są: procesy metaboliczne i apoptoza. Dla grupy P1 i P2 wzrost. Procesy komórkowe są specyficzne dla grupy P1, procesy wielopoziomowe oraz procesy organizmów wielokomórkowych dla grupy P3, a procesy komórkowe dla grupy P4. Procesy biologiczne o największej istotności statystycznej w grupie P1 to: reakcja na bodziec, procesy metaboliczne, regulacja biologiczna; w grupie P2: procesy metaboliczne, reakcja na bodziec, regulacja biologiczna; w grupie P3: procesy układu immunologicznego, regulacja biologiczna, reakcja na bodziec; w grupie P4: procesy metaboliczne, reakcja na bodziec, lokomocja.

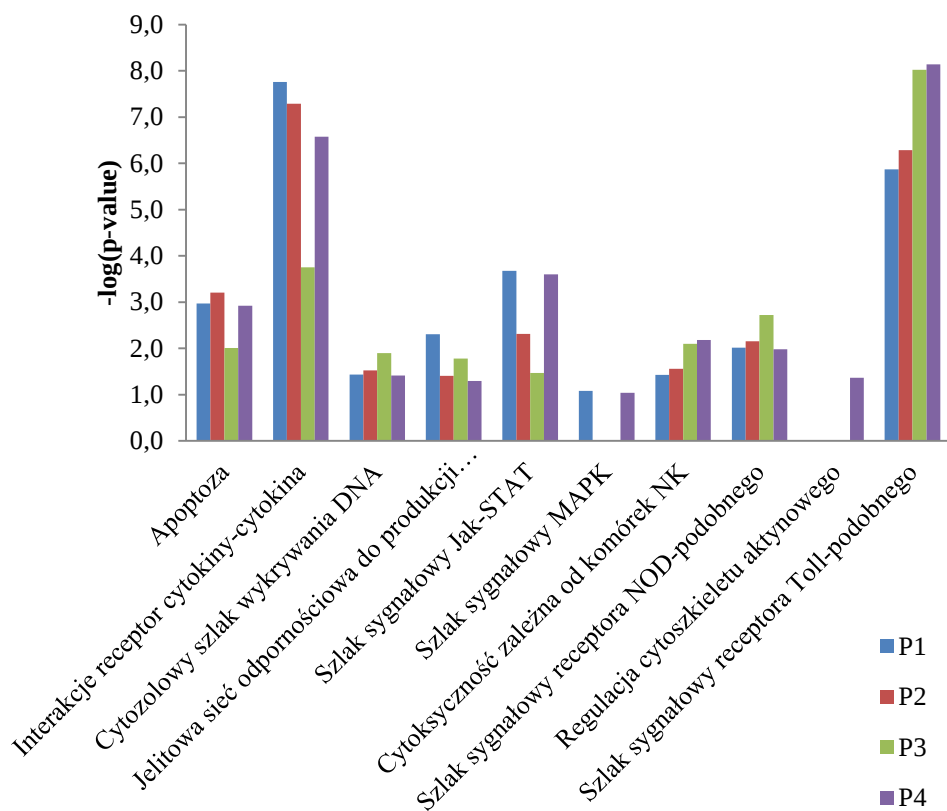
Tabela 6. Procesy biologiczne o zmienionej ekspresji dla linii komórkowej HD11 po stymulacji probiotykami

Proces biologiczny	Liczba	%	P-Value
P1			
GO:0050896~reakcja na bodziec	165	7.14	0.000065
GO:0008152~procesy metaboliczne	618	26.75	0.000077
GO:0065007~regulacja biologiczna	460	19.91	0.002518
GO:0040011~lokomocja	33	1.43	0.009966
GO:0002376~procesy układu immunologicznego	60	2.60	0.021401
GO:0016265~apoptoza	30	1.30	0.025874
GO:0009987~ procesy komórkowe	699	30.26	0.049195
GO:0040007~wzrost	18	0.78	0.063835
P2			
GO:0008152~procesy metaboliczne	570	26.89	0.000037
GO:0050896~reakcja na bodziec	153	7.22	0.000061
GO:0065007~regulacja biologiczna	417	19.67	0.007407
GO:0016265~apoptoza	29	1.37	0.014434
GO:0040011~lokomocja	30	1.42	0.016044
GO:0002376~procesy układu immunologicznego	54	2.55	0.038482
GO:0040007~wzrost	17	0.80	0.057421
P3			
GO:0002376~procesy układu immunologicznego	28	6.51	0.000001
GO:0065007~regulacja biologiczna	120	27.91	0.000014
GO:0050896~reakcja na bodziec	49	11.40	0.000023
GO:0040011~lokomocja	15	3.49	0.000145

GO:0051704~procesy wielopoziomowe	8	1.86	0.040509
GO:0032501~procesy organizmów wielokomórkowych	47	10.93	0.094143
P4			
GO:0008152~procesy metaboliczne	595	26.53	0.000266
GO:0050896~reakcja na bodziec	155	6.91	0.000550
GO:0040011~lokomocja	34	1.52	0.003274
GO:0065007~regulacja biologiczna	437	19.48	0.015220
GO:0002376~procesy układu immunologicznego	58	2.59	0.024935
GO:0009987~procesy komórkowe	681	30.36	0.029003
GO:0016265~apoptoza	28	1.25	0.049100

Procesy biologiczne zostały wygenerowane przy użyciu narzędzia DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) na podstawie DEG po stymulacji linii komórkowej HD11 przez: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036 (**P3**), *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). Liczba – liczba DEG wchodząca w dany proces biologiczny, % - procent jaki stanowią DEG danego procesu biologicznego w odniesieniu do wszystkich DEG w danej grupie, P-Value – istotność statystyczna wystąpienia zmian w danym procesie biologicznym.

We wszystkich grupach doświadczalnych stymulacja bakteriami probiotycznymi wpłynęła istotnie na te same szlaki (interakcje receptor cytokiny-cytokina, szlak sygnałowy receptora Toll-podobnego, szlak sygnałowy Jak-STAT, apoptoza, jelitowa sieć odpornościowa do produkcji przeciwciał IgA, szlak sygnałowy receptora NOD-podobnego, cytozolowy szlak wykrywania DNA, cytoksyczność zależna od komórek NK) związane z układem immunologicznym (Rys. 7). W grupach P1 i P2 bakterie dodatkowo wpłynęły na szlak sygnałowy MAPK, a w grupie P4 na "regulację cytoszkieletu aktynowego". Szlakami, dla których wpływ bakterii jest najbardziej istotny statystycznie są: szlak sygnałowy receptora Toll-podobnego i interakcje receptor cytokiny-cytokina.



Rys. 7. Szlaki dla DEG związanych z systemem immunologicznym. Szlaki zostały wygenerowane przy użyciu narzędzia DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>). Analizie zostały poddane tylko DEG związane z systemem immunologicznym dla wszystkich grup doświadczalnych: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036 (**P3**), *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**)

Tabele 7 i 8 prezentują dziesięć genów o najbardziej zwiększonej i dziesięć genów o najbardziej zmniejszonej ekspresji w każdej z eksperymentalnych grup. Geny o zwiększonej ekspresji wspólne dla wszystkich grup to: *INHBA*, *K123*, *TNFAIP6*; wspólne dla P1, P2 i P4: *IL12B*, *LOC770026*, *LIF*, *CCL20*, *IL6*, *PTGS2*; wspólne dla P1, P3 i P4: *MMP1*;

wspólne dla P2 i P3: *MMP9*; specyficzne tylko dla P3: *IL8L1*, *CCL4*, *CMBL*, *CYP3A7*.

Geny o zmniejszonej ekspresji wspólne dla wszystkich grup to: *LTB4R*, *GPR34*, *FGL2*, *CCR5*, *FUT7*; wspólne dla P1, P2 i P4: *C5ORF13*, *PTPN6*, *GPR65*; wspólne dla P1 i P3: *BLNK*; wspólne dla P1, P2 i P3: *PARVG*; specyficzne dla P2: *TLR7*; specyficzne dla P3: *DNASE2B*, *TSPAN15*, *KCTD12*; specyficzne dla P4: *P2RY8*, *CCR2*.

DEG w grupie P3 charakteryzują się mniejszymi zmianami FC w porównaniu z innymi grupami doświadczalnymi.

Tabela 7. DEG o najsilniej zwiększonej ekspresji

P1		P2		P3		P4	
Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC
<i>INHBA</i>	156.94	<i>INHBA</i>	142.74	<i>TNFAIP6</i>	26.63	<i>INHBA</i>	140.74
<i>IL12B</i>	137.59	<i>LOC770026</i>	126.27	<i>INHBA</i>	18.05	<i>LOC770026</i>	124.75
<i>LOC770026</i>	121.56	<i>LIF</i>	96.61	<i>IL8L1</i>	14.89	<i>IL12B</i>	111.84
<i>LIF</i>	107.84	<i>IL12B</i>	91.45	<i>CCL4</i>	12.17	<i>LIF</i>	108.3
<i>CCL20</i>	102.16	<i>K123</i>	82.55	<i>MMP9</i>	12.11	<i>IL6</i>	92.72
<i>K123</i>	92.16	<i>TNFAIP6</i>	63.5	<i>CMBL</i>	12.02	<i>K123</i>	92.11
<i>IL6</i>	83.91	<i>CCL20</i>	60.13	<i>MMP1</i>	11.94	<i>CCL20</i>	87.03
<i>MMP1</i>	74.64	<i>IL6</i>	57.96	<i>K123</i>	10.79	<i>TNFAIP6</i>	79.75
<i>TNFAIP6</i>	73.93	<i>PTGS2</i>	57.16	<i>MMP9</i>	10.67	<i>PTGS2</i>	71.27
<i>PTGS2</i>	66.47	<i>MMP9</i>	56.91	<i>CYP3A7</i>	10.61	<i>MMP1</i>	57.41

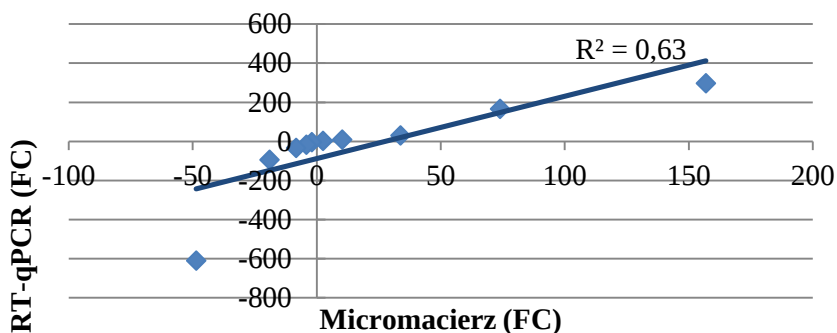
Linia komórkowa HD11 została stymulowana *in vitro* bakteriami probiotycznymi: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus plantarum* IBB 3036 (**P3**) lub *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). Ekspresja genów została oznaczona za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) z uwzględnieniem $P < 0,05$ i $-2 > FC > 2$.

Tabela 8. DEG o najsilniej zmniejszonej ekspresji

P1		P2		P3		P4	
Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC
<i>FUT7</i>	-48.61	<i>FUT7</i>	-45.94	<i>GPR34</i>	-11.91	<i>GPR65</i>	-46.9
<i>GPR65</i>	-39.67	<i>GPR65</i>	-35.18	<i>FGL2</i>	-9.82	<i>FUT7</i>	-37.92
<i>PTPN6</i>	-27.74	<i>PTPN6</i>	-29.8	<i>FUT7</i>	-8.65	<i>PTPN6</i>	-24.88
<i>CCR5</i>	-19.87	<i>FGL2</i>	-20.89	<i>CCR5</i>	-8.06	<i>C5ORF13</i>	-21.35
<i>C5ORF13</i>	-19.56	<i>TLR7</i>	-19.67	<i>LTB4R</i>	-6.24	<i>GPR34</i>	-20.03
<i>FGL2</i>	-19	<i>C5ORF13</i>	-18.04	<i>KCTD12</i>	-5.99	<i>CCR2</i>	-18.02
<i>GPR34</i>	-16.33	<i>GPR34</i>	-17.96	<i>PARVG</i>	-4.73	<i>FGL2</i>	-16.31
<i>PARVG</i>	-15.83	<i>CCR5</i>	-17.82	<i>BLNK</i>	-4.68	<i>P2RY8</i>	-16.24
<i>LTB4R</i>	-15.06	<i>PARVG</i>	-17.19	<i>TSPAN15</i>	-4.64	<i>CCR5</i>	-16.16
<i>BLNK</i>	-14.81	<i>LTB4R</i>	-16.83	<i>DNASE2B</i>	-4.27	<i>LTB4R</i>	-16.02

Linia komórkowa HD11 została stymulowana *in vitro* bakteriami probiotycznymi: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus plantarum* IBB 3036 (**P3**) lub *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). Ekspresja genów została oznaczona za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) z uwzględnieniem $P < 0,05$ i $-2 > FC > 2$.

W celu potwierdzenia wyników z całogenomowej mikromacierzy ekspresyjnej, dla dziesięciu genów o zróżnicowanej ekspresji (*INHBA*, *TNFAIP6*, *ITGB3*, *HAS2*, *PRKCI*, *DPP7*, *MCM5*, *SLC1A6*, *FGL2*, *FUT7*), przeprowadzono reakcję RT-qPCR. Zestawienie wyników przedstawiono na Rysunku 8 w postaci wykresu zależności wyników mikromacierzy od wyników RT-qPCR. Obliczono także współczynnik korelacji, który wynosi 0.79 ($R^2=0.63$). Wartość ta oznacza silną korelację między wynikami obydwu analiz. Ponadto, gdy usuniemy wyniki dla jednego, najbardziej odstającego od linii trendu genu (*FUT7*), to współczynnik korelacji wzrośnie do 0.98.



Rys. 8. Porównanie wyników mikromacierzy i RTqPCR linii komórkowej HD11 stymulowanej probiotykiem 1. Dane mikromacierzowe zostały wygenerowane z użyciem Microarray GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA); Wyniki RT-qPCR zostały uzyskane w wyniku amplifikacji starterów zaprojektowanych dla danych genów z użyciem barwnika SYBR green; Glucozo-6-fosfato dehydrogenaza (*G6PDH*) i beta-actyna (*ACTB*) zostały wykorzystane jako geny referencyjne; względna ekspresja genów została obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$; test t-Studenta został użyty do porównania grupy kontrolnej i doświadczalnej; Wyniki FC mniejsze od 1 zostały przekształcone według wzoru $-1/FC$; FC - Fold Change, analizy zostały wykonane dla linii komórkowej HD11 stymulowanej przez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (P1)

4.2. TEST PRZENIKANIA BARWNIKA I BAKTERII PROBIOTYCZNYCH

Bezpośrednio po podaniu *in ovo* indygokarminu (niebieski barwnik spożywczy, który w doświadczeniu ma imitować migrację prebiotyku) w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego do komory powietrznej jaja, nie zaobserwowano jego dyfuzji do wnętrza jaja. Barwnik pozostał w komorze powietrznej, mimo iż błona podskorupowa jest półprzepuszczalna, gdyż zawiera pory utworzone przez włókna fibrynogenu. W ciągu kolejnych dwóch dni po iniekcji *in ovo* zaobserwowano nieznaczne przenikanie barwnika między zewnętrzną, a wewnętrzną błoną podskorupową (Rys. 9A). W trzeciej dobie po iniekcji, indygokarmin zaobserwowano w błonie kosmówkowej znajdującej się pod komorą powietrzną (Rys. 9B). W szóstej dobie po iniekcji barwnik nadal był widoczny tylko w komorze powietrznej i błonie kosmówkowej znajdującej się pod komorą powietrzną (Rys. 9C). W szóstej dobie sprawdzono także obecność barwnika w przewodzie pokarmowym, lecz go nie zaobserwowano.

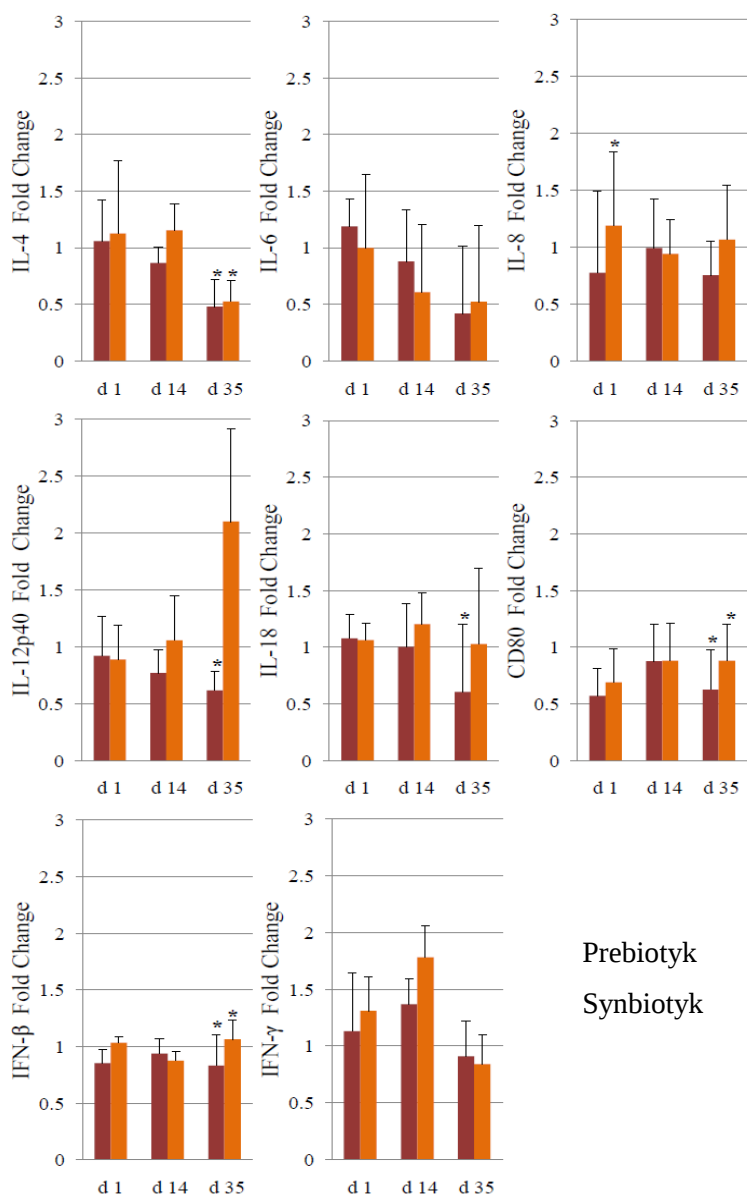


Rys. 9. Zdjęcie błony kosmówkowej po podaniu barwnika: A) po 1 dniu od iniekcji, B) po 3 dniach od iniekcji, C) po 6 dniach od iniekcji

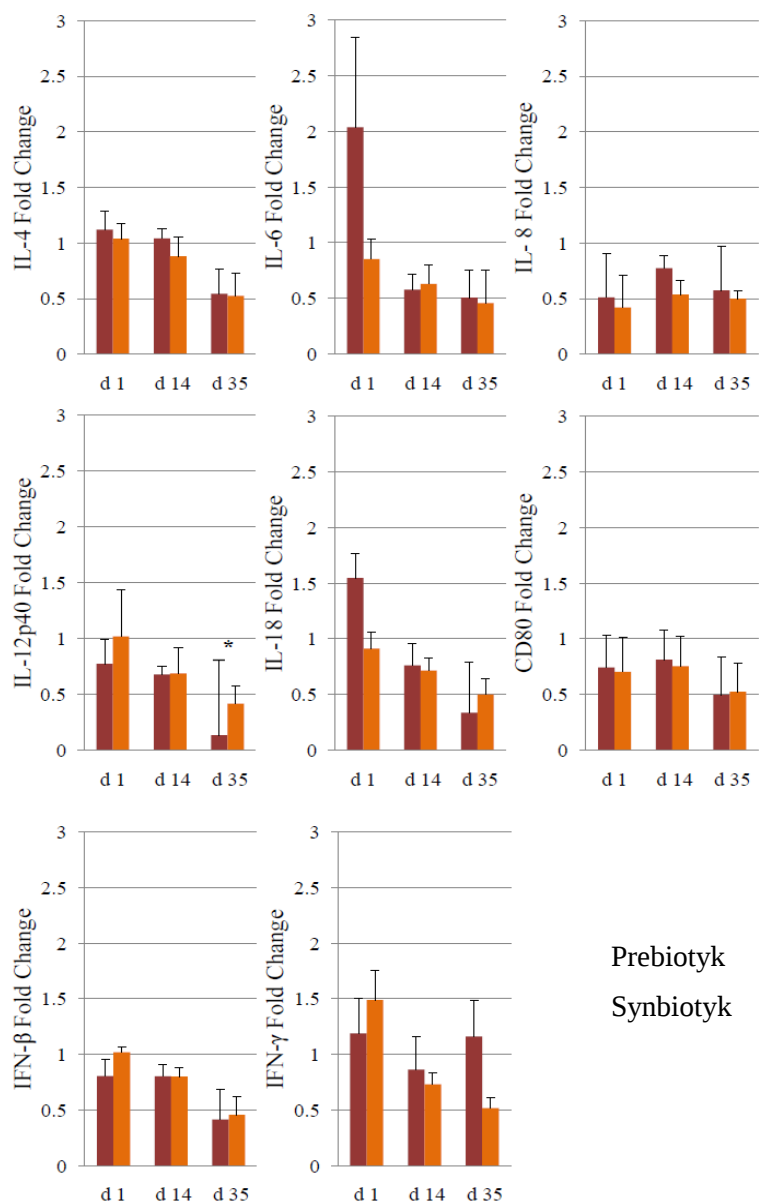
Po podaniu probiotyku *in ovo*, przez pierwsze sześć dni od iniekcji bakterie były wykrywalne tylko w komorze powietrznej. W okresie od 12-18 dnia inkubacji jaj, bakterie probiotyczne nie zdołały przeniknąć przez błonę podskorupową. W siódmym dniu po iniekcji, czyli w dziewiętnastej dobie rozwoju embrionalnego, bakterie zostały wykryte w płynie owodniowym, lecz tylko w jajach, w których zarodek przebił komorę powietrzną. W dwudziestym dniu rozwoju embrionalnego bakterie wykryto we fragmentach jelit zarodka.

4.3. WPLYW PREBIOTYKU I SYNBIOTYKU, PODANEGO IN OVO, NA EKSPRESJĘ GENÓW ZWIĄZANYCH Z UKŁADEM IMMUNOLOGICZNYM W CZASIE ROZWOJU OSOBNICZEGO KURCZĄT BROILERÓW

Względna analiza ekspresji dotyczyła panelu genów związanych z układem immunologicznym (*IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12p40*, *IL-18*, *CD80*, *IFN- β* and *IFN- γ*). Analizie poddano dwie tkanki: migdałki jelit ślepych (Rys. 10) oraz śledziony (Rys. 11) broilerów, którym podano *in ovo* probiotyk (P1: inulina) lub synbiotyk (S1: inulina + *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB 2955), a następnie w 1., 14. i 35. dniu życia pobrano tkanki do analiz. Dla *IL-4*, *IL-6*, *IL-12p40*, *IL-18*, *CD80* i *IFN- γ* zaobserwowano spadek ekspresji genów wraz z wiekiem kurcząt, przy czym zależność ta jest silniejsza w śledzionie niż w migdałkach jelit ślepych. Wpływ obu substancji bioaktywnych: prebiotyku i synbiotyku jest podobny. Największy spadek ekspresji zaobserwowano dla *IL-4*, *IL-6* w migdałkach jelit ślepych dla prebiotyku i synbiotyku oraz dla *IL-12p40*, *IL-18*, *CD80* dla prebiotyku w 35-tym dniu życia. Spośród zaobserwowanych zmian istotne statystycznie są tylko wyniki dla *IL-4*, *IL-12p40*, *IL-18*, *CD80*. W śledzionie odnotowano największe spadki ekspresji dla wszystkich badanych genów, przy czym były one już silnie zaznaczone w 14. dniu. Statystycznie istotne wyniki uzyskano dla *IL-12p40* w 35. dniu po podaniu prebiotyku.



Rys. 10. Względna ekspresja panelu genów związanych z układem immunologicznym (IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-18, CD80, IFN-β i IFN-γ) w migdałkach jelit ślepych broilerów po iniekcji probiotykiem (inulina) lub synbiotykiem (inulina + *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB 2955). Próby pobrano w pierwszym, czternastym i trzydziestym piątym dniu po wykluciu. Analiza ekspresji genów została wykonana metodą $\Delta\Delta C_t$. * rezultaty istotne statystycznie (test t-Studenta: $P < 0.05$)



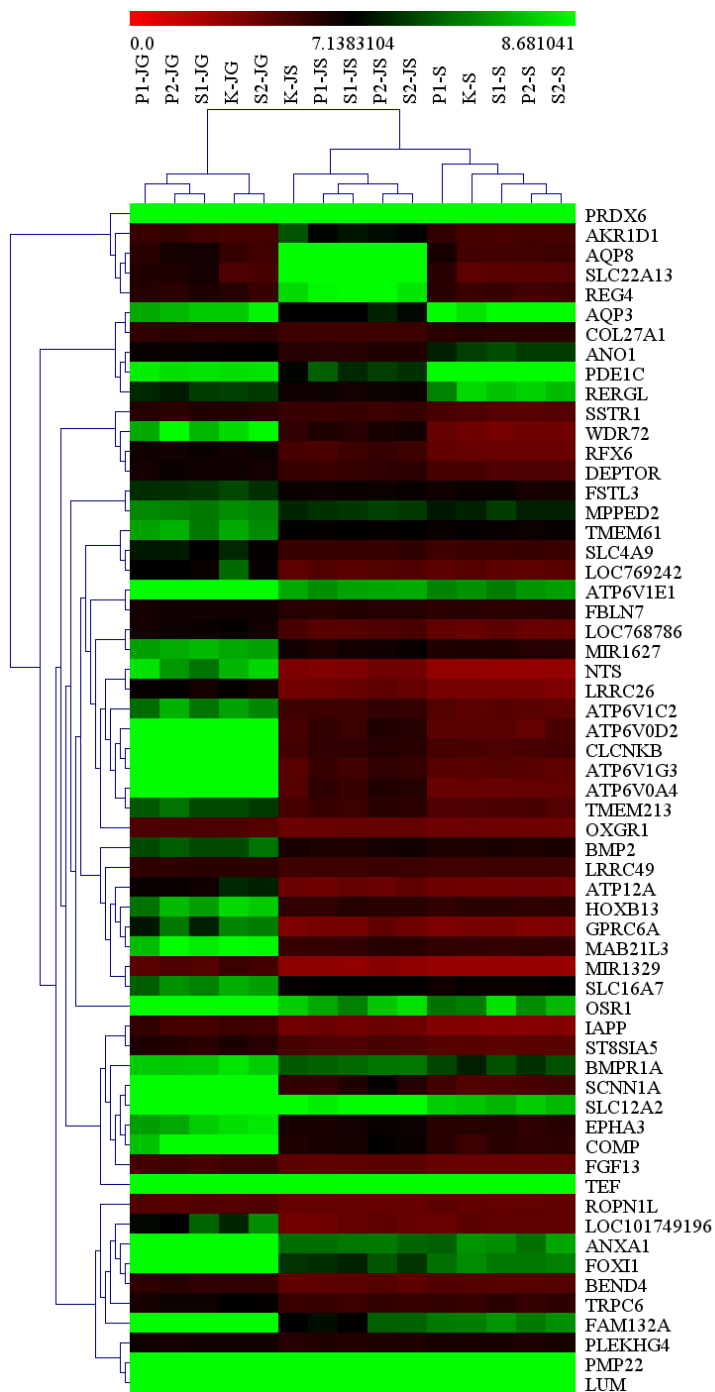
Rys. 11. Względna ekspresja panelu genów związanych z układem immunologicznym (IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-18, CD80, IFN-β i IFN-γ) w śledziona broilerów po iniekcji probiotykiem (inulina) lub synbiotykiem (inulina + *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB 2955). Próby pobrano w 1., 14. i 35. dniu po wykluciu. Analiza ekspresji genów została wykonana metodą $\Delta\Delta\text{Ct}$. * rezultaty istotne statystycznie (test t-Studenta: $P < 0.05$).

4.4. WPLYW PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW PODANYCH *IN OVO* NA TRANSKRYPTOM DOROSŁYCH KURCZĄT BROILERÓW

4.4.1. Ilościowa charakterystyka zmian w transkryptomie kurcząt broilerów

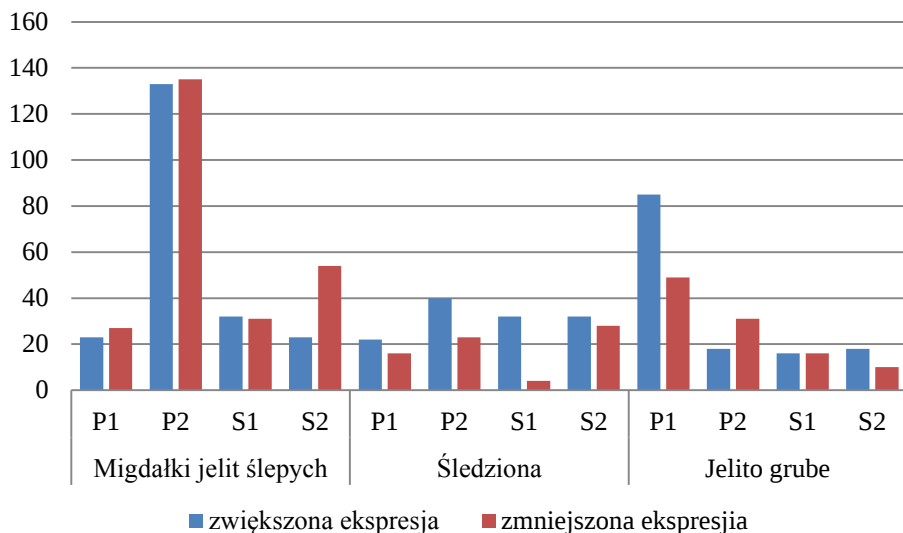
Celem opisywanego doświadczenia była weryfikacja efektów działania substancji biologicznie aktywnych (prebiotyk, synbiotyk) podanych *in ovo* na transkryptom w 35 dobie życia kurcząt broilerów. Całogenomowa analiza ekspresji genów była przeprowadzona w trzech tkankach: migdałkach jelit ślepych, śledzionie i jelicie grubym.

Hierarchiczna analiza wzorców ekspresji między grupami eksperymentalnymi i kontrolną została zaprezentowana w postaci *HeatMap* (z ang. mapy cieplne) na Rysunku 12. Typ tkanki był głównym kryterium hierarchizacji, niezależnie od czynnika doświadczalnego. Wzorzec ekspresji genów w migdałkach jelit ślepych jest mocniej skorelowany z wzorcem ekspresji w śledzionie niż w jelicie grubym. Biorąc pod uwagę wpływ czynnika doświadczalnego, S2 posiada wzorzec najbardziej przypominający K w jelicie grubym. Geny ulegające ekspresji w migdałkach jelit ślepych i śledzionie w grupie kontrolnej, nie zostały zgrupowane z inną grupą doświadczalną. Wykazano także, że wzorce zmian ekspresji dla każdej tkanki są specyficzne, gdyż niezależnie od podanego czynnika doświadczalnego tkanki zostały zgrupowane razem. Dla jelita grubego wzorce ekspresji były najbardziej zbliżone między grupą P2 i S1 następnie między S2 i K. Dla migdałków jelit ślepych najbardziej zbliżone wzorce uzyskano dla P1 i S1 oraz P2 i S2. W przypadku śledziony największe podobieństwo wykazano dla S2 i P2, i w dalszej kolejności: S1, K i P1. Porównując wzorce ekspresji między tkankami można zauważyć, że śledziona i migdałki jelit ślepych mają bardziej zbliżony wzorzec pomiędzy sobą niż do jelita grubego.



Rys. 12. Hierarchicznie grupowanie sygnatur ekspresji genów u kurcząt po iniekcji *in ovo*. Do komory powietrznej jaj w 12. dobie rozwoju embrionalnego podano inulinę – grupa P1, GOS – grupa P2, inulinę z dodatkiem *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955- grupa S1, GOS z dodatkiem *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 – grupa S2. Ekspresję genów badano w śledzionie (S), migdałkach jelit ślepych (JS) oraz w jelicie grubym (JG) w 35. dniu życia za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA). Do analizy wykorzystano wyniki o $P\text{-value} < 0,5$ oraz $-1,65 > FC > 1,65$. Do budowy HeatMap wykorzystano program Multiexperiment Viewer w wersji 4.9 (MeV)

Wpływ prebiotyków i synbiotyków na liczbę genów o zmienionej ekspresji zaprezentowano na Rysunku 13. W grupie doświadczalnej P2 w migdałkach jelit ślepych zaobserwowano największą liczbę genów o zmienionej ekspresji (133 geny o zwiększonej ekspresji i 135 o zmniejszonej). Podanie *in ovo* prebiotyku GOS w śledzionie również spowodowało znaczącą liczbę zmian w ekspresji genów (40 geny o zwiększonej ekspresji i 23 o zmniejszonej ekspresji). W jelicie grubym najwięcej zmian w ekspresji genów zaobserwowano w grupie doświadczalnej, która otrzymała *in ovo* inulinę (P1) (85 geny o zwiększonej ekspresji i 49 o zmniejszonej ekspresji). Najmniejszą liczbę genów o zmienionej ekspresji odnotowano w jelicie grubym po podaniu galaktooligosacharydu GOS z dodatkiem *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 (S2) (18 geny o zwiększonej ekspresji i 10 o zmniejszonej ekspresji). W śledzionie najmniej zmian w poziomie ekspresji genów odnotowano w grupie, której podano inulinę z dodatkiem *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955 (S1) (32 geny o zwiększonej ekspresji i 4 o zmniejszonej ekspresji). Natomiast dla migdałków jelit ślepych najmniej zmian zaobserwowano po podaniu inuliny (P1) (23 geny o zwiększonej ekspresji i 27 o zmniejszonej ekspresji).

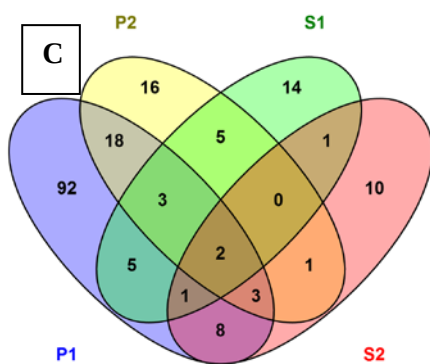
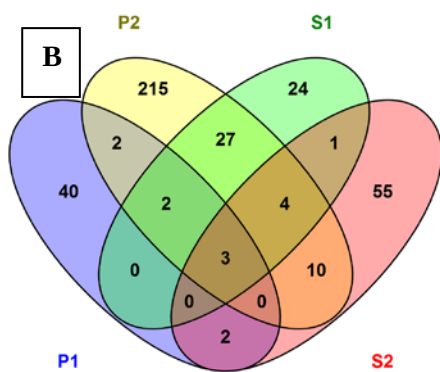
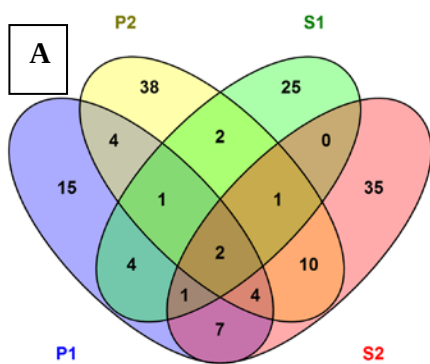


Rys. 13. Liczba genów o zmienionej ekspresji u kurcząt po iniekcji *in ovo*. Do komory powietrznej jaj w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego podano inulinę – grupa P1, GOS – grupa P2, inulinę z dodatkiem *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955- grupa S1, GOS z dodatkiem *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 – grupa S2. Ekspresję genów badano w śledzionie (S), migdałkach jelit ślepych (JS) oraz w jelicie grubym (JG) w trzydziestym piątym dniu życia za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA). Do zestawienia wykorzystano wyniki o $P\text{-value} < 0,5$ oraz $-1,65 > FC > 1,65$

4.4.2. Funkcjonalna analiza zmian w transkryptomie kurcząt broilerów

W celu sprawdzenia, czy czynniki doświadczalne wpłynęły na ekspresję tych samych genów w obrębie tych samych tkanek, skonstruowano diagramy Venna, przedstawiające wspólne i indywidualne elementy zbiorów (Rys. 14). Analiza ta wykazała mały udział genów, których zmiana ekspresji występowałaby we wszystkich grupach eksperymentalnych. W migdałkach jelit ślepych najczęściej podobieństw występuje między grupą P2 a S1 (27 genów), w śledzionie między grupami P2 i S2 (10 genów), w jelicie grubym między grupami P1 i S2 (8 genów). Większość genów o zmienionej ekspresji występuje wyłącznie w obrębie jednej grupy doświadczalnej. W śledzionie procent genów o zmienionej ekspresji występujących wyłącznie w jednej grupie to 39% dla P1, 62% dla P2, 69% dla S1, 70% dla S2. Podobna zależność występuje we

wszystkich badanych tkankach i grupach doświadczalnych. Zaobserwowano zależność: im więcej genów o zmienionej ekspresji występuje w danej tkance i grupie eksperymentalnej, tym większy jest ich procentowy udział w puli genów specyficznych dla danej tkanki/grupy doświadczalnej.



Rys. 14. Diagramy Venna przedstawiające geny o zmienionej ekspresji wspólne i specyficzne w obrębie grup po iniekcji *in ovo*. Do komory powietrznej jaj w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego podano inulinę – grupa P1, GOS – grupa P2, inulinę z dodatkiem *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955- grupa S1, GOS z dodatkiem *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 – grupa S2. Ekspresję genów badano w śledzionie (A), migdałkach jelit ślepych (B) oraz w jelicie grubym (C) w trzydziestym piątym dniu życia za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA). Diagramy skonstruowano za pomocą Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)

W Tabeli 9 jest zaprezentowanych 5 genów o największym wzroście ekspresji, a w Tabeli 10 o najsilniejszym spadku ekspresji we wszystkich grupach eksperymentalnych i dla każdej tkanki. W grupie genów o podwyższonej ekspresji dominują te, które są związane z transportem, natomiast w grupie genów o obniżonej ekspresji geny związane z układem immunologicznym. Zależność ta występuje dla wszystkich grup doświadczalnych i dla każdej z badanych tkanek.

Tabela. 9. Geny o największym wzroście ekspresji

Tkanka	Grupa	Gen	FC	Opis
JS	P1	<i>SLC26A4</i>	3.6	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 4
		<i>RPS29</i>	3.4	ribosomal protein S29
		<i>RRBP1</i>	2.1	ribosome binding protein 1
		<i>HIST1H2B8</i>	2.1	histone cluster 1, H2B-VIII
		<i>RP11-411B6.6</i>	2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial
JS	P2	<i>SLC13A2</i>	3.8	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2
		<i>STEAP1</i>	2.6	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
		<i>GSTA4</i>	2.6	glutathione S-transferase alpha 4
		<i>RPS29</i>	2.5	ribosomal protein S29
		<i>LOC423943</i>	2.5	deleted in malignant brain tumors 1-like
JS	S1	<i>LOC423943</i>	3.2	deleted in malignant brain tumors 1-like
		<i>SLC13A2</i>	2.5	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2
		<i>RPS29</i>	2.4	ribosomal protein S29
		<i>GSTA4</i>	2.2	glutathione S-transferase alpha 4
		<i>SERPINB5</i>	2.1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
JS	S2	<i>ATP6V0A4</i>	3.1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a4

S		<i>RPS29</i>	3	ribosomal protein S29
		<i>BG2</i>	2.8	intestinal zipper protein
		<i>ATP6V1G3</i>	2.1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G3
		<i>GNG13</i>	2.1	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13
	P1	<i>FGFR3</i>	2.6	fibroblast growth factor receptor 3
		<i>RP11-411B6.6</i>	2.2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial
		<i>LGALS2</i>	2.1	lectin, galactoside-binding, soluble, 2
		<i>TLCD1</i>	2	TLC domain containing 1
		<i>NRXN1</i>	1.9	neurexin 1
	P2	<i>CLGN</i>	2.9	Calmegin
		<i>LGALS2</i>	2.5	lectin, galactoside-binding, soluble, 2
		<i>RP11-411B6.6</i>	2.2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial
		<i>KCNMB1</i>	2	potassium channel subfamily M regulatory beta subunit 1
		<i>IL17REL</i>	1.9	interleukin 17 receptor E-like
	S1	<i>GHRH</i>	2.3	growth hormone releasing hormone
		<i>SPOCK3</i>	2.2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3
		<i>GP9</i>	2	glycoprotein IX (platelet)
		<i>IFI6</i>	2	interferon, alpha-inducible protein 6

		<i>RP11-411B6.6</i>	1.9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial
S	S2	<i>SNORD20</i>	8.1	small nucleolar RNA, C/D box 20
		<i>GAL7</i>	3.1	Gal 7
		<i>RPS29</i>	2.8	ribosomal protein S29
		<i>GAL2</i>	2.5	gallinacin 2
		<i>RP11-411B6.6</i>	2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial
JG	P1	<i>SLC26A3</i>	30	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 3
		<i>SLC13A2</i>	16	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2
		<i>CYP2K1L</i>	13	cytochrome P450 2K1-like
		<i>CA7</i>	9.6	carbonic anhydrase VII
		<i>OTOP3</i>	6.6	otopetrin 3; otopetrin 2
JG	P2	<i>CA7</i>	9.2	carbonic anhydrase VII
		<i>SLC26A3</i>	6	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 3
		<i>IRG1L</i>	4.7	immunoresponsive 1 homolog (mouse)-like
		<i>CA4</i>	4.3	carbonic anhydrase IV
		<i>SLC13A2</i>	4	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2
JG	S1	<i>SLC13A2</i>	5.1	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2
		<i>CA4</i>	2.9	carbonic anhydrase IV

		<i>SNORD20</i>	2.2	small nucleolar RNA, C/D box 20
		<i>AVD</i>	1.9	Avidin
		<i>LIPG</i>	1.9	lipase, endothelial
JG	S2	<i>SLC13A2</i>	5.8	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2
		<i>SLC26A3</i>	4.3	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 3
		<i>CYP2K1L</i>	3.4	cytochrome P450 2K1-like
		<i>MIR141</i>	3.4	microRNA 141
		<i>FGG</i>	3.3	fibrinogen gamma chain

Tabela przedstawia 5 genów o najbardziej zwiększonej ekspresji w obrębie grup po iniekcji *in ovo*. Do komory powietrznej jaj w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego podano inulinę – grupa P1, GOS – grupa P2, inulinę z dodatkiem *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955- grupa S1, GOS z dodatkiem *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 – grupa S2. Ekspresję genów badano w śledzionie (S), migdałkach jelit ślepych (JS) oraz w jelicie grubym (JG) w trzydziestym piątym dniu życia za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA). Do analizy użyto genów o $P\text{-value} < 0,05$ i $-1.65 < FC < 1,65$.

Tabela 10. Geny o największym spadku ekspresji

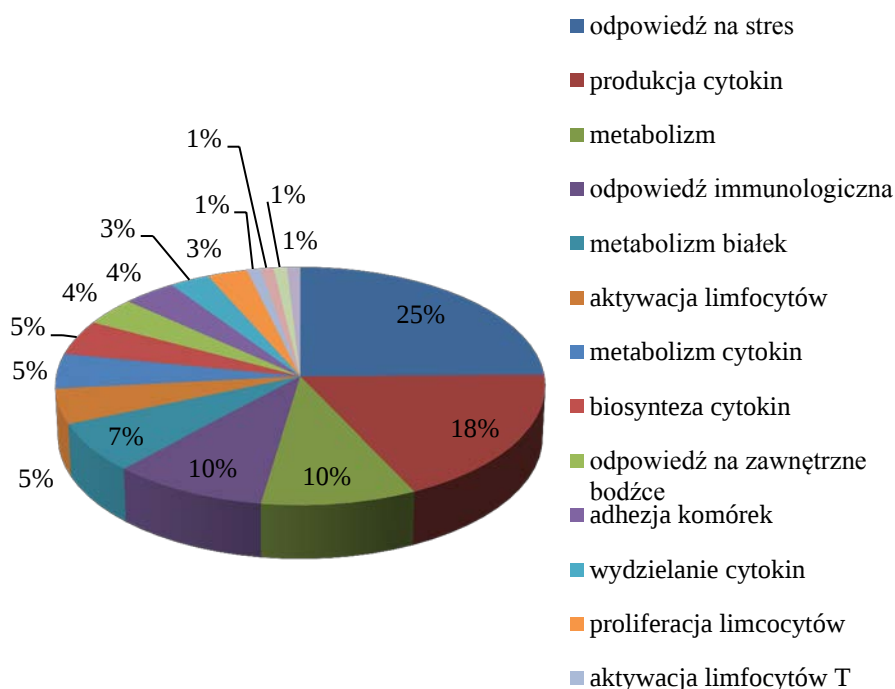
Tkanka	Grupa	Gen	FC	Opis
JS	P1	<i>LOC422513</i>	-2.1	hect domain and RLD 4-like
		<i>MAMDC2</i>	-2.1	MAM domain containing 2
		<i>LOC422513</i>	-2	hect domain and RLD 4-like
		<i>ANOS1</i>	-1.9	anosmin 1
		<i>CYR61</i>	-1.9	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
JS	P2	<i>TCF7</i>	-4	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)
		<i>CD72AG</i>	-3.9	CD72 antigen
		<i>LAMP3</i>	-3.8	lysosomal-associated membrane protein 3
		<i>SLAMF1</i>	-3.2	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
		<i>SLC7A11</i>	-3.1	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11
JS	S1	<i>MIR1674</i>	-4.1	microRNA mir-1674
		<i>FAM26F</i>	-2.2	family with sequence similarity 26, member F
		<i>SLC6A18</i>	-2.2	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 18
		<i>CD1B</i>	-2	CD1b molecule
		<i>VPREB3</i>	-1.9	pre-B lymphocyte 3
JS	S2	<i>CXCR5</i>	-3.1	chemokine (C-X-C motif) receptor 5
		<i>C4BPA</i>	-3.1	complement component 4 binding protein, alpha
		<i>MIR1770</i>	-3.1	microRNA mir-1770
		<i>SYK</i>	-2.7	spleen tyrosine kinase
		<i>AICDA</i>	-2.5	activation-induced cytidine deaminase

S	P1	<i>LGR6</i>	-2.1	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 6
		<i>CNTN3</i>	-1.9	contactin 3 (plasmacytoma associated)
		<i>NCAM2</i>	-1.9	neural cell adhesion molecule 2
		<i>MIR6516</i>	-1.8	microRNA mir-6516
		<i>PNPLA3</i>	-1.7	patatin-like phospholipase domain containing 3
S	P2	<i>LOC425137</i>	-3.6	aldo-keto reductase family 1, member B1-like
		<i>LOC431321</i>	-2.3	Keratin
		<i>PARM1</i>	-1.9	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
		<i>OR8U1</i>	-1.9	olfactory receptor, family 8, subfamily U, member 1
		<i>MIR1694</i>	-1.7	microRNA mir-1694
S	S1	<i>MIR1674</i>	-2	microRNA mir-1674
		<i>MIR1612</i>	-1.8	microRNA mir-1612
		<i>FAM26F</i>	-1.6	family with sequence similarity 26, member F
S	S2	<i>LOC425137</i>	-2.5	aldo-keto reductase family 1, member B1-like
		<i>RNF215</i>	-2.1	ring finger protein 215
		<i>MIR1680</i>	-2	microRNA mir-1680
		<i>MGAT5B</i>	-1.9	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase, isozyme B
		<i>MIR6516</i>	-1.9	microRNA mir-6516
JG	P1	<i>NR4A3</i>	9.3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
		<i>NIM1K</i>	5.9	NIM1 serine/threonine protein kinase
		<i>AOX2</i>	6.1	aldehyde oxidase 2
		<i>ADAMTS1</i>	8.8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1

		<i>VSNL1</i>	8.6	visinin-like 1
JG	P2	<i>HECW1</i>	-2.3	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
		<i>NIM1K</i>	-2.3	NIM1 serine/threonine protein kinase
		<i>AOX2</i>	-2.2	aldehyde oxidase 2
		<i>GAL10</i>	-1.9	Gal 10
		<i>LOC431321</i>	-1.8	Keratin
JG	S1	<i>ENPP3</i>	-2.1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
		<i>HBAA</i>	-2	hemoglobin, alpha 1; hemoglobin subunit alpha-A-like
		<i>BID</i>	-1.9	BH3 interacting domain death agonist
		<i>GAL10</i>	-1.7	Gal 10
		<i>TMEM86A</i>	-1.7	transmembrane protein 86A
JG	S2	<i>GSTT1L</i>	-2.1	glutathione S-transferase theta 1-like
		<i>LOC396480</i>	-1.6	Keratin
		<i>MIR1790</i>	-1.6	microRNA mir-1790; chromosome 8 open reading frame 48
		<i>EDAR</i>	-1.6	ectodysplasin A receptor
		<i>LOC431321</i>	-1.5	Keratin

Tabela przedstawia 5 genów o najbardziej zmniejszonej ekspresji w obrębie grup po iniekcji *in ovo*. Do komory powietrznej jaj w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego podano inulinę – grupa P1, GOS – grupa P2, inulinę z dodatkiem *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955- grupa S1, GOS z dodatkiem *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 – grupa S2. Ekspresję genów badano w śledzionie (S), migdałkach jelit ślepych (JS) oraz w jelicie grubym (JG) w trzydziestym piątym dniu życia za pomocą mikromacierzy GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA). Do analizy użyto genów o P-value<0,05 i -1.65<FC<1,65

W celu ustalenia na jakie funkcje biologiczne wpłynął GOS (P2) w migdałkach jelit ślepych, listę genów o zmienionej ekspresji zaimportowano do programu DAVID, który następnie wyeksportował listę procesów biologicznych, dla których prawdopodobieństwo zmian jest istotne statystycznie. Otrzymana lista procesów składa się z blisko 700 rekordów. Wyniki analiz zostały zgrupowane za pomocą programu CateGORizer i przedstawione na Rysunku 15. Procesy biologiczne, których ekspresja uległa zmianie po podaniu *in ovo* P2 w migdałkach jelit ślepych, były związane głównie: z odpowiedzią na stres (25%), produkcją cytokin (18%), metabolizmem (10%), odpowiedzią immunologiczną (10%), metabolizmem białek (7%). Pozostałe kategorie procesów biologicznych były związane z funkcjami układu immunologicznego.



Rys. 15. Skategoryzowane anotacje GO dla DEG w migdałkach jelit ślepych w grupie P2. GO terms zostały wygenerowane przy użyciu narzędzia DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) na podstawie DEG po iniekcji *in ovo* przez P2, a następnie skategoryzowane za pomocą narzędzia cateGORizer (<http://www.animalgenome.org/tools/catego/>)

Dla migdałków jelit ślepych z grupy P2 oznaczono także, szlaki metaboliczne, których ekspresja mogła zmienić, zostały przedstawione w Tabeli 11. Szlaki o najmniejszym P Value, które świadczy o silnych zmianach w ekspresji to: biosynteza steroidów, biosynteza glikofosfolipidowa - seria lakto i neolakto, transportery ABC.

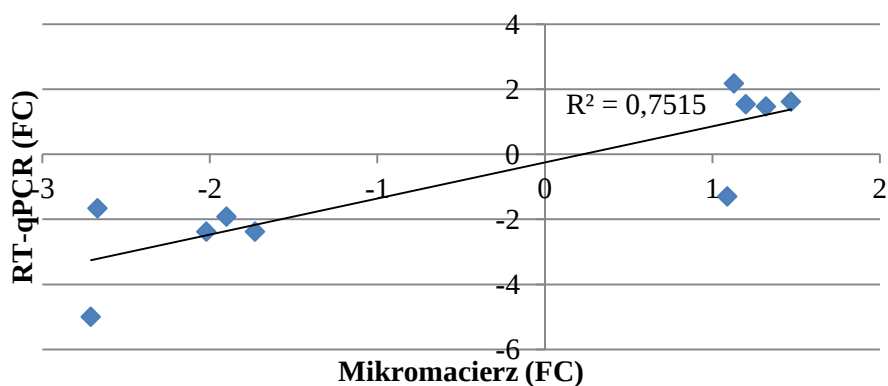
Tabela 11. Szlaki metaboliczne będące pod wpływem prebiotyku GOS/P2 w migdałkach jelit ślepych

Szlak biologiczny	Liczba genów	P Value
gga00100:Biosynteza steroidów	4	0.0029166
gga00601: Biosynteza glikofosfolipidowa - seria lakto i neolakto	4	0.0054257
gga02010:Transportery ABC	4	0.0259781
gga01100:Szlaki metaboliczne	26	0.0591567
gga00514: Inne rodzaje biosyntezy O-glikanu	3	0.0902567
gga04270: Skurcz mięśni gładkich naczyń	5	0.0988708

Szlaki biologiczne, na które miał wpływ P2 zostały wygenerowane przy użyciu narzędzia DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) na podstawie DEG po iniekcji *in ovo* przez P2.

4.5. WALIDACJA WYNIKÓW MIKROMACIERZY PRZY POMOCY RT-QPCR

W celu potwierdzenia wyników z całogenomowej mikromacierzy ekspresyjnej, dla dziesięciu genów o zróżnicowanej ekspresji (*SLC6A18*, *CD1B*, *LGALS3*, *PAPOLA*, *SYK*, *TLR7*, *NFATC1*, *CD36*, *GP9*, *SERPINB12*), przeprowadzono reakcję RT-qPCR. Zestawienie wyników przedstawiono na Rysunku 16 w postaci wykresu zależności wyników mikromacierzy od wyników RT-qPCR. Obliczono także współczynnik korelacji, który wynosi 0.87 ($R^2=0.75$). Wartość ta oznacza silną korelację między wynikami obydwu analiz.



Rys 16. Porównanie wyników mikromacierzy i RTqPCR dla broilerów w 35. dniu życia. Dane mikromacierzowe zostały wygenerowane z użyciem Microarray GeneChip 1.1 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA); Wyniki RT-qPCR zostały uzyskane w wyniku amplifikacji starterów zaprojektowanych dla danych genów z użyciem barwnika SYBR green; Glucozo-6-fosfato dehydrogenaza (*G6PDH*) i beta-actyna (*ACTB*) zostały wykorzystane jako geny referencyjne; względna ekspresja genów została obliczona metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$; test t-Studenta został użyty do porównania grupy kontrolnej i doświadczalnej; Wyniki FC mniejsze od 1 zostały przekształcone według wzoru $-1/FC$; FC - Fold Change

5. DYSKUSJA

5.1. INIEKCJA *IN OVO* – MIGRACJA PREBIOTYKU I PROBIOTYKU

Poznanie drogi migracji substancji bioaktywnych: prebiotyków oraz bakterii probiotycznych, po iniekcji *in ovo*, było niezbędnym krokiem do scharakteryzowania ich wpływu na zmiany w transkryptomie kurcząt broilerów na skutek stymulacji mikrobiomu.

Droga przenikania prebiotyku po iniekcji *in ovo* została prześledzona z wykorzystaniem substancji, o podobnym wzorze sumarycznym, wielkości cząsteczki, takiej która nie szkodzi zarodkom oraz jest łatwa do obserwacji. Powyższe wymagania spełnia indygokarmin (inne nazwy: indygotyna, karmin indygo). Jest on organicznym związkiem chemicznym, disulfonową pochodną indyga o wzorze sumarycznym $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ i masie molowej 466 g/mol. Związek ten jest stosowany w medycynie i przemyśle jako niebieski barwnik (jako barwnik spożywczy ma oznaczenie E132) i jako odczynnik chemiczny [Ross i wsp. 2000]. Założono iż sposób w jaki przenika przez błonę podskorupową i struktury jaja powinien być zbliżony do prebiotyku Bi²Tos (galaktooligosacharyd - **GOS**) o wzorze sumarycznym $C_{18}H_{32}O_{16}$ i masie molekularnej 504 g/mol [Depeint i wsp. 2008]__(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/165512#section=Top>).

Drugi stosowany w badaniach własnych prebiotyk to inulina. Prebiotyk ten jest polisacharydem (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i3754?lang=en®ion=PL>) o wzorze sumarycznym $(C_6H_{10}O_5)_{36}$ i masie molekularnej 6624 g/mol. W przypadku tego prebiotyku różnice w wielkości cząsteczki w stosunku do indygokarminu są znacznie większe. Dlatego należy przyjąć, iż ewentualna migracja inuliny będzie znacznie wolniejsza niż stosowanego barwnika.

Błona podskorupowa jaja kurzego zbudowana jest z włókien kolagenu, który tworzy pory o średnicy od kilku do kilkunastu μm . Pory te są jedyną drogą przez którą dochodzi do wymiany substancji między rozwijającym się zarodkiem, a środowiskiem zewnętrznym. Wymiana substancji odbywa się na poprzez bierną wymianę na zasadzie dyfuzji [Parsons 1982, Tsai i wsp. 2006, Zhao i Chi 2009]. W przeprowadzonym doświadczeniu barwnik przeniknął przez błonę podskorupową dopiero po trzech dniach od iniekcji. Może to świadczyć o jednostajnej, stopniowej dyfuzji. Przy czym, im mniejsza masa molekularna i lepsza rozpuszczalność w wodzie iniekowanej substancji, tym szybciej będzie ona przenikała przez błonę podskorupową. Podobne wyniki zostały uzyskane w doświadczeniu przeprowadzonym przez Edwardsa. Autorzy

Ci, wykazali, iż barwnik może przenikać przez struktury jaja, a następnie lokalizować się w przewodzie pokarmowym [Edwards i wsp. 2016].

Bakterie probiotyczne nie przedostały się przez błonę podskorupową, aż do chwili przebicia błony przez rozwijający się zarodek, gdyż nie posiadają mechanizmów umożliwiających jej penetrację. Zdolność penetracji błony podskorupowej posiadają bakterie patogenne które są w stanie przejść przez nią w ciągu 1-3 dni [Berrang i wsp. 1999]. Bakterie patogenne często wyposażane są w mechanizmy umożliwiające penetrację – rzęski, które umożliwiają ruch; enzymy proteolityczne, które rozkładają infekowane tkanki.

Uzyskane wyniki podkreślają zasadność stosowanie prebiotyków i probiotyków na drodze iniekcji *in ovo* do komory powietrznej jaja w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego, ponieważ:

- prebiotyk stopniowo przedostaje się do układu pokarmowego pisklęcia, przez co po wykluciu stymuluje naturalną probiotyczną mikroflorę,
- probiotyk kolonizuje przewód pokarmowy od chwili przebicia komory powietrznej przez zarodek, co następnie utrudnia zasiedlenie przewodu pokarmowego przez bakterie potencjalnie patogenne.

5.2. WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOSTYMULUJĄCE PROBIOTYKÓW

Odpowiedź makrofagów na stymulację bakteriami probiotycznymi jest procesem bardzo złożonym. Z jednej strony zależy on od kompetencji samych komórek układu immunologicznego, zwłaszcza od obecności odpowiednich receptorów TLR. Z drugiej zaś od specyficznych właściwości mikroorganizmów, które posiadają charakterystyczne dla siebie antygeny aktywujące odpowiednie receptory TLR. Dopiero połączenie antygeny bakteryjnego ze specyficznym receptorem na powierzchni lub wewnątrz makrofaga zapoczątkowuje odpowiedź immunologiczną. Specyficzne antygeny, danej bakterii probiotycznej, mogą wpłynąć na wywołanie odpowiedzi pro- lub antyzapalnej, co jest związane odpowiednio z immunostymulacją lub immunoregulacją.

Badania prowadzone z wykorzystaniem kurczącej linii HD11 wykazały ekspresję wszystkich znanych TLR występujących u ptaków [KANNAKI i wsp. 2010][Keestra i wsp. 2013]. W badaniach własnych wykazano iż komórki linii HD11 posiadają wszystkie niezbędne receptory rozpoznające antygeny bakteryjne takie jak: lipopolisacharydy, peptydoglikany, lipoproteiny, flagelinę i inne. Doniesienia literaturowe potwierdzają przydatność tej linii komórkowej

jako modelu *in vitro* do oceny immunostymulacyjnych właściwości prebiotyków [Ciraci i wsp. 2010; Elsheimer-Matulova i wsp. 2015; Van Dijk i wsp. 2016].

W badaniach własnych hierarchiczne grupowanie sygnatur ekspresji genów, wykazało że trzy zastosowane probiotyki *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**) and *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**) spowodowały bardzo podobną zmianę w transkryptomie kurczęcej linii monocytów HD11. Jedynie zmiany wywołane przez *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036 (**P3**) znacząco odbiegają od pozostałych grup eksperymentalnych. Co więcej, sygnatury ekspresji genów dla tej grupy doświadczalnej były bardziej podobne do grupy kontrolnej, niż do pozostałych grup. Probiotyki P1 i P2 należą do tego samego gatunku *Lactococcus lactis*, dlatego nie jest zaskoczeniem, że wywołały podobną odpowiedź, gdyż tylko nieznacznie różnią się fenotypowo i genotypowo [Nomura i wsp. 2000]. Probiotyki P3 i P4 należą do tego samego rodzaju *Lactobacillus*, ale są to różne gatunki bakterii. Dong wraz ze współpracownikami wykazał że odpowiedź immunologiczna wywołana przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jest specyficzna dla danego szczepu i przejawia się różnym wpływem na ekspresję cytokin takich jak: *IL-10*, *IFN-γ*, *TNF-α*, *IL-12*, *IL-6* [Dong i wsp. 2012]. Specyfika odpowiedzi makrofaga na daną bakterię probiotyczną może wynikać z budowy ściany komórkowej bakterii. Bakterie *Lactobacillus* o grubszej, trudnej do strawienia ścianie komórkowej, takie jak: *Lactobacillus casei*, wywołują odpowiedź prozapalną charakteryzującą się zwiększoną ekspresją *IL-12*. Natomiast szczepy o cieńszej, łatwiejszej do strawienia ścianie komórkowej, takie jak: *Lactobacillus johnsonii* i *Lactobacillus plantarum*, charakteryzują się indukowaniem odpowiedzi antyzapalnej, w której wzrasta ekspresja *IL-12* [Shida i wsp. 2009].

Na różnice w intensywności odpowiedzi immunologicznej (wzrost poziomu ekspresji genów związanych z układem immunologicznym) jak i jej charakter (pro- lub antyzapalny) ma wpływ nie tylko grubość ściany komórkowej bakterii probiotycznych lecz także specyficzne metabolity (takie jak egzopolisacharydy) produkowane przez dany szczep oraz białka obecne w ścianie komórkowej [Meijerink i wsp. 2010]. Szczepy *Lactobacillus salivarius* stymulują układ immunologiczny w odmienny sposób, niż *Lactobacillus plantarum* [Jensen i wsp. 2015], a charakter odpowiedzi jest specyficzny dla danego szczepu [Drago i wsp. 2010]. *Lactobacillus plantarum* IBB 3036, zastosowany w badaniach własnych spowodował znacznie słabszą odpowiedź na poziomie ekspresji genów (około 4 razy mniej genów o zmienionej ekspresji oraz kilkakrotnie niższa krotność zmian tej ekspresji) w porównaniu do pozostałych bakterii. Wśród genów o podwyższonej ekspresji przez ten probiotyk jest wiele związanych ze wczesną odpowiedzią prozapalną (*IL-1b*, *IL-8*), nie zaobserwowano natomiast zwiększonej ekspresji *IL-12*, która we wcześniej przytoczonych pracach jest uważana za wyznacznik

immunostymulacyjnych właściwości probiotyków. Można zatem uznać, że spośród bakterii probiotycznych użytych do stymulacji komórek linii HD11 najsilniejsze właściwości immunostymulujące posiadają: *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* oraz *Lactobacillus salivarius*. Natomiast *Lactobacillus plantarum* cechuje się znacznie słabszymi właściwościami immunostymulującymi. Jednoznaczna weryfikacja właściwości immunomodulacyjnych *Lactobacillus plantarum* IBB 3036 możliwa jest jedynie z zastosowaniem modelu linii makrofagów typu M2. Do otrzymania odpowiedzi o charakterze antyzapalnym niezbędne są makrofagi typu M2, różniące po stymulacji przez komórki dendrytyczne obecne w jelitach [Shapiro i wsp. 2011].

Analiza transkryptomu HD11, z wykorzystaniem całogenomowej mikromacierzy ekspresyjnej wykazała duże podobieństwo w liczbie genów o zmienionej ekspresji w grupach P1, P2 i P4 (około 1800 genów o zwiększonej ekspresji i około 1050 genów o zmniejszonej ekspresji). Natomiast probiotyk P3 spowodował wzrost ekspresji 232 genów, a spadek 279. Geny związane z układem immunologicznym stanowią tylko mały ułamek wszystkich genów o zmienionej ekspresji. Dla P1, P2 i P4 liczba genów związanych z układem immunologicznym o zmienionej ekspresji wynosi około 60, natomiast w grupie P3 tylko 28. Zdecydowana większość genów (około 98%), których ekspresja uległa zmianie po podaniu substancji bioaktywnych *in ovo* jest związana z metabolizmem. Kontakt makrofaga z bakterią probiotyczną powoduje aktywację makrofagów. Efektem tej aktywacji jest zwielokrotnienie produkcji cytokin prozapalnych, np: *IL-1B*, *IL-8*, *IL-12* przez makrofaga. Zmianie ulega też ich metabolizm na specyficzny dla makrofagów typu M1, odpowiedzialnych za odpowiedź prozapalną [Freemerman i wsp. 2014; Kramer i wsp. 2014]. Efektem tej zmiany jest przejście z oddychania tlenowego na beztlenową glikolizę, objawiającą się w: indukcji bardziej aktywnej izoformy fosfofruktokinazy (*PFK*), zwiększonym pobieraniu glukozy niezależnym od insuliny (transporter glukozy *GLUT-1*) –glikolizie do pirogronianu (np kinaza pirogronianowa typu M) oraz konwersji pirogronianu do mleczanu (dehydrogenaza mleczanowa) przez co aktywowany makrofag ma zwiększony dostęp do substancji energetycznych [Shapiro i wsp. 2011]. W badaniach własnych bakterie P1, P2 i P3 spowodowały zwiększenie poziomu ekspresji genów: *GLUT-6*, *PFKFB3*, *G6PC2*, które potwierdzają zmianę metabolizmu nieaktywnych makrofagów (nie biorących udziału w odpowiedzi immunologicznej), na metabolizm typowy dla makrofagów biorących udział w odpowiedzi prozapalnej. Stymulacja linii komórkowej HD11 szczepem bakteryjnym *Lactobacillus plantarum* nie spowodowała zmiany w ekspresji powyższych genów związanych ze zmianą metabolizmu. Pośrednim potwierdzeniem zmiany w metabolizmie komórek, w trakcie stymulacji, jest zmiana koloru medium hodowlanego z różowego na żółty. W badaniach własnych pełna zmiana koloru medium nastąpiła po sześciu godzinach

inkubacji, w grupach stymulowanych przez bakterie. Zmiana koloru medium świadczy o zakwaszeniu medium metabolitami powstałymi w procesie glikolizy (takich jak mleczany).

O przekształceniu się natywnych makrofagów w typ M1 świadczy nie tylko zmiana metabolizmu, ale też rodzaj produkowanych cytokin i chemokin. W badaniach własnych dowiedziono zwiększoną ekspresję prozapalnych cytokin: *TNFAIP6*, *IL-1 β* , *IL-6*, *IL8L1*, *IL8L2*, *IL-12b* oraz chemokin biorących udział w odpowiedzi prozapalnej: *CCL1*, *CCL4*, *CCLI10*, *CCL20*. Poziom ekspresji powyższych genów w grupach eksperymentalnych: P1, P2 i P4 (w stosunku do kontroli) jest około 100 razy wyższy dla *IL-12b*, *IL-6* i *CCL20*, kilkadziesiąt razy wyższy dla pozostałych genów. W grupie P3 ekspresja *TNFAIP6* wzrosła 26 razy, natomiast pozostałych genów od kilku do kilkunastu razy. Powyższe wyniki potwierdzają, iż bakterie probiotyczne: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* oraz *Lactobacillus salivarius* poprzez zwielokrotnienie ekspresji prozapalnych cytokin i chemokin spowodowały silną immunostymulację makrofagów linii HD11. W przypadku *Lactobacillus plantarum* efekt ten jest kilkukrotnie słabszy. Analizy szlaków metabolicznych (DAVID) przeprowadzone dla genów związanych z odpowiedzią immunologiczną potwierdzają, iż zmianom ulegają szlaki wchodzące w skład prozapalnej odpowiedzi immunologicznej. Szlaki te biorą udział w rozpoznawaniu MAMPs, transdukcji sygnału do wnętrza komórki: szlak odpowiedzi toll podobny [Mei i wsp. 2013; Wachi i wsp. 2014; Zelaya i wsp. 2014; Mariman i wsp. 2014]; szlak odpowiedzi receptora NOD podobnego [Yanagihara i wsp. 2014]; szlak odpowiedzi MAPK [Kim i wsp. 2006; Latvala i wsp. 2008; Iyer i wsp. 2008; Wang i wsp. 2014; Jeong i wsp. 2015]; doprowadzają do ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną: szlak sygnałowy Jak-STAT (Sun i wsp. 2005; Yeganegi i wsp. 2010). Reasumując odpowiedź makrofagów jest zgodna z modelem zaprezentowanym w literaturze.

Wykorzystane w badaniach własnych szczepy bakterii probiotycznych (z wyjątkiem *Lactobacillus plantarum*) wykazały silne właściwości immunostymulujące. Probiotyki o takich właściwościach stymulują przekształcenie natywnych monocytów do typu M1, który produkuje między innymi czynnik martwicy nowotworu. Dlatego też szczepy bakterii o właściwościach immunostymulacyjnych mogą być wykorzystywane jako suplement diety nie tylko u drobiu ale również u człowieka. W przypadku ludzi stosowanie takich suplementów diety może wesprzeć zapobieganie powstawaniu nowotworów oraz do wspomagania leczenia nowotworów takich jak rak okrężnicy [Kumar i wsp. 2010; Sanders i wsp. 2016]. Ponadto, probiotyki o właściwościach immunostymulujących przygotowują układ immunologiczny do obrony przed patogenami. Może to nastąpić poprzez wzmocnienie pierwotnej odpowiedzi wynikającej ze zwiększonej ekspresji

receptorów rozpoznających patogeny takich jak TLR2 [Galdeano i Perdigón 2006]. Probiotyki aktywują także komórki układu immunologicznego – monocyty i komórki dendrytyczne, przez co mogą one szybciej reagować na obecne patogeny [Perdigón i wsp. 2002]. Probiotyczne szczepy bakterii zwiększają produkcję IgA w przewodzie pokarmowym, która przeciwdziała jego kolonizacji przez mikroorganizmy chorobotwórcze [Perdigon i wsp. 1995].

5.3. WPLYW PREBIOTYKU I SYNBIOTYKU NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY W CIĄGU ŻYCIA BROILERÓW

Wpływ prebiotyku i synbiotyku na układ immunologiczny broilerów określono poprzez analizę zmian w ekspresji genów związanych z układem immunologicznym. Testowym probiotykiem była inulina (P1) natomiast synbiotykiem inulina z dodatkiem *L. lactis subsp. lactis* IBB2955 (S1). Zastosowany prebiotyk i synbiotyk był wcześniej wykorzystany do stymulacji *in vitro* kurzej linii komórkowej DT40 [Sławińska i wsp. 2016]. Inulina w połączeniu z *L. lactis subsp. lactis* IBB2955 spowodowała zmianę ekspresji genów związanych z układem immunologicznym, takich jak *CD80*, *IFN-β*, *IL-4*, *IL-6*, *MAP2K3*, *MyD88* i *TLR2* w komórkach B kurcząt (linia komórek DT40). W doświadczeniu sprawdzającym wpływ prebiotyku i synbiotyku na układ immunologiczny po iniekcji *in ovo* w dwunastym dniu rozwoju embrionalnego, również wykazano zmiany w ekspresji genów związanych z układem immunologicznym. Analizowany panel genów zawierał cytokiny związane z odpowiedzią typu Th-1 (*IFN-β*, *IFN-γ* i *IL-18*), Th-2 (*IL-4*), prozapalne (*IL-6* i *IL-12p40*), hemokinę *IL-8* oraz cząsteczkę ko-stymulującą *CD80*. Wzorce ekspresji powyższych genów na poziomie mRNA w trzech różnych punktach czasowych (1 dzień po wylęgu, 14 dzień po wylęgu i 35 dzień po wylęgu) w migdałkach jelit ślepych oraz śledzionach kurcząt, wskazywał na ogólną tendencję do spadku ekspresji genów związanych z układem immunologicznym wraz z wiekiem broilerów.

Poziom obniżenia ekspresji badanych genów był zdecydowanie większy w przypadku śledziony. Różnice we wzorcach ekspresji genów między tymi dwoma organami limfatycznymi po podaniu prebiotyku i synbiotyku *in ovo* można wyjaśnić różnym poziomem ekspozycji na antygeny występujące w przewodzie pokarmowym. Migdałki jelitowe są częścią GALT, dlatego są one w bliskim sąsiedztwie mikroflory jelitowej i są stale narażone na kontakt z MAMP. W doświadczeniu przeprowadzonym *in vitro*, w którym komórki mononuklearne śledziony i migdałków jelit ślepych stymulowano bakteriami kwasu mlekowego (LAB) wykazano iż migdałki jelit ślepych szybciej reagują

na bodźce bakteryjne [Brisbin i wsp. 2008; Brisbin i wsp. 2010]. Z drugiej strony efekty regulacji genów w splenocytach utrzymały się dłużej.

Zjawisko spadku poziomu ekspresji cytokin można wyjaśnić poprzez wytworzenie tolerancji pokarmowej. Układ immunologiczny przewodu pokarmowego jest stale narażony na kontakt ze składnikami pokarmowymi pochodzącymi ze środowiska wraz z którymi pobierane są również mikroorganizmy. Układ immunologiczny gospodarza musi zrównoważyć reakcję pomiędzy zwalczaniem patogennych i tolerowaniem komensalnych bakterii [Pabst i Mowat 2012]. Zjawisko tolerancji pokarmowej chroni gospodarza przed powstaniem odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom niepatogennym pochodzącym z żywności [Burks i wsp. 2008; Friedman 2008]. Stabilny skład mikroflory przewodu pokarmowego i brak kolonizacji przez nowe patogenne bakterie sprzyja wytworzeniu tolerancji immunologicznej przez błony śluzowe jelit. W eksperymencie przeprowadzonym w ramach tej dysertacji doktorskiej takie efekty były wywołane przez stymulację mikroflory jelitowej i wyrażały się przez obniżenie poziomu sygnatur ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną.

Badania przeprowadzone na kurach rasy Zielononóżka kuropatwiana, reprezentujących rodzimą rasę kur, wykazały inny trend zmian ekspresji genów związanych z układem immunologicznym. Po podaniu prebiotyków i synbiotyków *in ovo*, znacząco zwiększył się poziom ekspresji genów IL-4, IL-6, IFN- β i IL-18 w śledzionie, a jednocześnie zmniejszył IL-12 i IFN- γ w migdałkach jelit [Sławinska i wsp. 2014]. Doświadczenie przeprowadzone w ramach tej dysertacji doktorskiej wykonane było z wykorzystaniem komercyjnych, szybko rosnących kurcząt broilerów, charakteryzują się szybkim tempem wzrostu i skuteczną konwersją paszy na masę ciała. [Van Der Most i wsp. 2011]. Badania porównawcze kurcząt brojlerów i kur niosek dostarczyły dowodów na to, iż kurczęta mięsne rozwijają silną krótkoterminową odporność humoralną [Koenen i wsp. 2002], ale za to niższą produkcję cytokin [Leshchinsky i Klasing 2001]. Za mechanizm leżący u podstaw tej zależności może być odpowiedzialna selekcja na cechy produkcyjne u drobiu mięsnego. Wysoki poziom cytokin, a co za tym idzie – zwiększona aktywność układu immunologicznego wpływa negatywnie na przyrost masy ciała. U kur typu mięsnego do hodowli wybiera się osobniki o najwyższych przyrostach masy ciała, a co za tym idzie – o mniejszej aktywności układu immunologicznego. [Van Der Most i wsp. 2011].

5.4. WPLYW PREBIOTYKÓW I SYNBIOTYKÓW NA TRANSKRYPTOM ŚLEDZIONY, JELITA GRUBEGO I MIGDAŁKÓW JELIT ŚLEPYCH

Jednym z poważnych zagrożeń dla zdrowia nowo wyklutych piskląt są słabo rozwinięte jelita, ponieważ nie zasiedlają ich jeszcze komensalne bakterie tworzące mikrobiom, przez co tkanka limfatyczna związana z jelitami (GALT) nie jest jeszcze w pełni wykształcona [Kajiwara i wsp. 2003]. Kolonizacja przewodu pokarmowego przez komensalne drobnoustroje tworzące mikrobiom musi nastąpić jak najszybciej, aby uniknąć infekcji jelitowych, i przyspieszyć dojrzewanie układu immunologicznego. W naturze mikrobiom kurcząt rozwija się przez kontakt z odchodami dorosłych ptaków oraz otaczającą ściółkę, które są rezerwuarem mikroorganizmów. W komercyjnych wylęgarniach, sterylne środowisko, nie dopuszcza do kolonizacji przewodu pokarmowego przez mikroorganizmy komensalne. Prebiotyki, probiotyki i synbiotyki w warunkach produkcyjnych są podawane w paszy. W niniejszej pracy substancje bioaktywne podano w nowatorski sposób, aby przyspieszyć wykształcenie mikrobiomu jelit. Dlatego prebiotyki i synbiotyki podano już dwunastej dobie rozwoju embrionalnego, do komory powietrznej jaja.

W przeprowadzonym doświadczeniu zbadano wpływ podania prebiotyków i synbiotyków *in ovo* na modulację ekspresji genów w śledzionie, migdałkach jelit ślepych i jelicie grubym. Wpływ wczesnej modulacji zarodków kurzych zależy od użytej substancji bioaktywnej i analizowanej tkanki. Jak wykazano powyżej, substancją, która wywołała najwięcej zmian w ekspresji genów, był prebiotyk GOS (P2) w migdałkach jelit ślepych. GOS jest galaktooligosacharydem powstałym w wyniku hydrolizy laktozy przez galaktozylotransferazę z *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 [Tzortzis i wsp. 2005]. W badaniach innych naukowców wykazano, iż prebiotyk ten zmniejszenia inwazyjność *Salmonelli enterica* serovar *Typhimurium* w mysich i świńskich modelach *in vitro* i *in vivo* [Tzortzis i wsp. 2005; Searle i wsp. 2009]. Układ immunologiczny ptaków nie posiada strukturalnych węzłów chłonnych, dlatego istotna część odpowiedzi immunologicznej zachodzi w śledzionie i tkance limfoidalnej rozproszonej wzdłuż powierzchni błon śluzowych, tzn. tkance limfatycznej związanej z błoną śluzową (MALT). Istotna część MALT znajduje się w obrębie GALT i składa się z kępek Peyera, torby Fabrycjusza i licznych grudek limfoidalnych, obecnych głównie w migdałkach jelit ślepych [Friedman i wsp. 2003]. Migdałki jelit ślepych zawierają aż 45,7% grudek limfatycznych, dlatego są głównym źródłem funkcji immunologicznej w przewodzie pokarmowym kury. Ponadto GALT łączy się ze śledzioną za pośrednictwem wspólnej błony śluzowej, co sugeruje, że bakterie jelitowe wpływają nie tylko na reakcje miejscowe, ale również na systemowe [Cesta 2006]. W odniesieniu do wyników uzyskanych w niniejszej

pracy, zdecydowana większość zmian molekularnych po podaniu *in ovo* prebiotyku lub synbiotyku została wykryta w GALT (reprezentowanej przez migdałki jelit ślepych), mniej w śledzionie, która łączy się z GALT za pośrednictwem błony śluzowej, a zdecydowanie najmniej w jelicie grubym. Można to przypisać różnicom anatomicznym i funkcjonalnym między badanymi tkankami. Śledziona jest zaangażowana w ogólnoustrojową odpowiedzi immunologiczną, podczas gdy jelito grube jest pozbawione grudek limfatycznych, a zatem jego komunikacja z mikrobiomem jelit jest ograniczona [Lundin i wsp. 2008].

Porównanie liczby genów wspólnych i specyficznych dla wszystkich grup doświadczalnych za pomocą diagramów Venna wykazało, że prebiotyki (P1, P2) i synbiotyki (S1, S2) aktywowały różne zestawy genów we wszystkich tkankach. Oznacza to, iż prebiotyki i synbiotyki podane *in ovo* spowodowały odmienną reakcję organizmu. Synbiotyki stosowane w tym eksperymencie zostały opracowane w oparciu o trzyetapową procedurę selekcji, wynikającą ze wcześniejszych badań, mającą na celu:

1. określenie synergistycznej interakcji między prebiotykiem i probiotykiem *in vitro*,
2. ocenie potencjału immunomodulacyjnego synbiotyku wobec komórek gospodarza *in vitro* [Sławińska i wsp. 2016],
3. określenie dawek prebiotyków i synbiotyków podawanych *in ovo* w oparciu o badania *in vivo*.

Pomimo tego starannego wyboru różnice w ekspresji genów między kurczętami, którym podano prebiotyk i odpowiedni mu synbiotyk (zawierającymi ten sam prebiotyczny składnik) były dość zaskakujące. Prebiotyk GOS wpłynął na zmianę ekspresji większej liczby genów w migdałkach jelit ślepych niż synbiotyk zawierający GOS i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477. Zjawisko to może tłumaczyć wcześniej opisane doświadczenie przedstawiające czas przenikania prebiotyku i probiotyku z komory powietrznej do wnętrza jaja. Prebiotyki, jako węglowodory składające się z kilkunastu (GOS) lub kilkudziesięciu (inulina) atomów węgla są w stanie szybko przedostać się do wnętrza jaja. Jednakże, bakterie probiotyczne ze względu na ich duże rozmiary (kilka – kilkanaście μm) nie mogą przeniknąć przez błonę podskorupową i jako takie mogą być pochłonięte przez pisklę w momencie wylęgu. Ponieważ bakterie probiotyczne, które podano *in ovo* podczas eksperymentu mogą wykorzystywać prebiotyki jako źródła węgla, można spekulować, iż część prebiotyku została przez bakterie zmetabolizowana, zanim przedostała się do embrionu. Może to wyjaśnić, dlaczego sam prebiotyk miał silniejszy wpływ na GALT niż ten sam prebiotyk podany w połączeniu z bakteriami probiotycznymi. Silniejszy efekt działania prebiotyków może też być spowodowany faktem, iż po podaniu *in ovo*

stymuluje rozwój naturalnej probiotycznej mikroflory kurcząt – specyficznej dla drobiu. Stosowany w badaniach prebiotyk (GOS) był izolowany z mleka i nie jest gatunkowo specyficzny dla drobiu. Badania prowadzone na myszach z naturalnym mikrobiomem i zmienionym na mikrobiom człowieka, wykazały iż te o zmienionym są bardziej podatne na zakażenia bakteryjne drogą pokarmową [Kau i wsp. 2012].

Analiza procesów biologicznych, które uległy zmianie (funkcjonalna analiza zmian w transkryptomie - rozdział 4.4.2) wskazuje, że GOS posiada silny potencjał immunomodulacyjny. Podanie tej substancji bioaktywnej *in ovo* powoduje zmianę ekspresji genów związanych z układem immunologicznym w GALT. Kategoryzacja procesów biologicznych (za pomocą programu cateGORizer) z bazą danych dotyczących odpowiedzi immunologicznej wykazała, że większość genów o zmienionej ekspresji w migdałkach jelit ślepych po podaniu GOS uczestniczyła w aktywacji i różnicowaniu limfocytów. Przy wyjaśnianiu tego zjawiska należy rozważyć wzajemne oddziaływanie mikrobiomu i organizmu gospodarza jako integralnej całości kształtującej funkcje przewodu pokarmowego. Kurczęcy GALT jest niedojrzały w momencie wylęgu i nie może dać pełnej odpowiedzi immunologicznej na potencjalne patogeny [Smith i wsp. 2013]. Nowo wyklute pisklęta polegają głównie na wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, dopóki ich przewód pokarmowy nie zostanie skolonizowany przez mikroflorę, co pobudza dojrzewanie GALT [Bar-Shira i Friedman 2006]. Istnieją dowody, że w ciągu pierwszych kilku dni po wylęgu, GALT ptaków ulega gwałtownym zmianom [Friedman i wsp. 2003], w tym migracji limfocytów T z grasicy i zwiększenia liczby komórek B [Madej i Bednarczyk 2016]. Uzyskanie pełnej funkcjonalności immunologicznej przez GALT u nowo wyklutych kurcząt wiąże się z kolonizacją przewodu pokarmowego przez komensalną mikroflorę, a następnie ewolucją do stabilnego mikrobiomu, który zapewnia homeostazę immunologiczną i konkurencyjne wykluczenie enteropatogenów (NURMI i RANTALA 1973). Populacje drobnoustrojów przewodu pokarmowego u kurcząt osiągają stałą liczbę w czwartym dniu po wylęgu, co wskazuje, że wczesna stymulacja korzystnej mikroflory jest bezwzględnie koniecznością, gdyż w istotny sposób wpływa na całe życie danego osobnika [Ballou i wsp. 2016]. W związku z tym, dostarczanie bifidogenego prebiotyku (np. GOS) do zarodkowego GALT jest skutecznym sposobem promowania proliferacji miejscowej mikroflory probiotycznej i szybszego dojrzewania odpowiedzi immunologicznych jelit. Przeprowadzone doświadczenia dostarczają dowodów, iż iniekcja *in ovo* prebiotykiem przyczynia się do długotrwałych zmian w funkcji GALT, wyrażonych długoterminową regulacją szlaków metabolicznych związanych z układem immunologicznym. Procesy biologiczne, których ekspresja uległa zmianie, zidentyfikowane w migdałkach jelit ślepych po podaniu GOS wskazują, że u dorosłych brojlerów silniej rozwinięta była adaptacyjna odpowiedź immunologiczna. W immunologicznie

dojrzałym GALT, najskuteczniejszą strategią ochrony jelit przed bakteriami jelitowymi jest zneutralizowanie antygenów związanych z komórkami nabłonkowymi [Lillehoj i Trout 1996]. Organizm osiąga to przez wydzielanie neutralizujących przeciwciał przez limfocyty nabłonkowe jelit (IEL).

6. WNIOSKI

1. Prebiotyk przenika przez błonę podskorupową w ciągu dwóch dni od podania *in ovo* w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego do komory powietrznej jaja.
2. Probiotyk, po podaniu *in ovo* w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego do komory powietrznej jaja, pozostaje w niej do chwili przebiccia jej przez rozwijający się zarodek w dziewiętnastym dniu rozwoju embrionalnego.
3. Podanie prebiotyku lub synbiotyku, *in ovo* w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego do komory powietrznej jaja, powoduje spadek ekspresji genów związanych z układem immunologicznym wraz z wiekiem kurcząt.
4. Prebiotyk podany *in ovo* ma silniejszy wpływ na zmiany ekspresji genów niż odpowiadający mu synbiotyk.
5. Prebiotyki spowodowały zmianę ekspresji innych genów, niż odpowiadające im synbiotyki.
6. Najwięcej zmian w ekspresji genów wywołał prebiotyk GOS.
7. W migdałkach jelit ślepych i śledzienie zaobserwowano najwięcej genów o zmienionej ekspresji na skutek podania substancji bioaktywnych *in ovo*.

SPIS PIŚMIENNICTWA

1. Alloui, M. N., Szczurek, W., Świątkiewicz, S. (2013). The Usefulness of Prebiotics and Probiotics in Modern Poultry Nutrition: a Review / Przydatność prebiotyków i probiotyków w nowoczesnym żywieniu drobiu – przegląd. *Annals of Animal Science*, 13(1), 17–32. <http://doi.org/10.2478/V10220-012-0055-X>
2. Ballou, A. L., Ali, R. A., Mendoza, M. A., Ellis, J. C., Hassan, H. M., Croom, W. J., Koci, M. D. (2016). Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, 3. <http://doi.org/10.3389/fvets.2016.00002>
3. Bar-Shira, E., Friedman, A. (2006). Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(10), 930–941. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2005.12.002>
4. Bengmark, S. (2013). Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.002>
5. Berrang, M. E., Frank, J. F., Buhr, R. J., Bailey, J. S., Cox, N. A. (1999). Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella typhimurium*. *Journal of food protection*, 62(1), 73–6. Pobrano z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921833>
6. Beug, H., von Kirchbach, A., D??derlein, G., Conscience, J. F., Graf, T. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 18(2), 375–390. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90057-6](http://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90057-6)
7. Brisbin, J. T., Gong, J., Parvizi, P., Sharif, S. (2010). Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(9), 1337–1343. <http://doi.org/10.1128/CVI.00143-10>
8. Brisbin, J. T., Gong, J., Sharif, S. (2008). Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Animal Health Research Reviews*, 9(1), 101–110. <http://doi.org/10.1017/S146625230800145X>
9. Budiño, F. E. L., Thomaz, M. C., Kronka, R. N., Nakaghi, L. S. O., Tucci, F. M., Fraga, A. L., ... Huaynate, R. A. R. (2005). Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 921–929. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132005000800008>

10. Burks, A. W., Laubach, S., Jones, S. M. (2008). Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.037>
11. Carragher, D. M., Rangel-Moreno, J., Randall, T. D. (2008). Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in Immunology*. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2007.12.004>
12. Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 599–608. <http://doi.org/10.1080/01926230600865531>
13. Chow, J., Lee, S. M., Shen, Y., Khosravi, A., Mazmanian, S. K. (2010). Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Advances in Immunology*, 107(C), 243–274. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-381300-8.00008-3>
14. Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., ... Kasper, D. L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149(7), 1578–1593. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>
15. Ciraci, C., Tuggle, C. K., Wannemuehler, M. J., Nettleton, D., Lamont, S. J. (2010). Unique genome-wide transcriptome profiles of chicken macrophages exposed to Salmonella-derived endotoxin. *BMC genomics*, 11, 545. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-545>
16. Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., l'Anson, K., Gibson, G. R. (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 785–791. <http://doi.org/10.1093/ajcn/87/3/785> [pii]
17. Dobson, A., Cotter, P. D., Paul Ross, R., Hill, C. (2012). Bacteriocin production: A probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>
18. Dong, H., Rowland, I., Yaqoob, P. (2012). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *The British journal of nutrition*, 108(3), 459–70. <http://doi.org/10.1017/S0007114511005824>
19. Drago, L., Nicola, L., Iemoli, E., Banfi, G., De Vecchi, E., Solis-Pereyrs, B., ... Pot, B. (2010). Strain-dependent release of cytokines modulated by Lactobacillus salivarius human isolates in an in vitro model. *BMC Research Notes*, 3(1), 44. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-3-44>
20. Druart, C., Alligier, M., Salazar, N., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. (2014). Modulation of the Gut Microbiota by Nutrients with Prebiotic and Probiotic Properties. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 5(5), 624S–633S. <http://doi.org/10.3945/an.114.005835>

21. Edwards, N. M., Heberle, N. D., Hynd, P. I. (2016). The Effect of In ovo Administration of L-Arginine on the Hatchability and Embryological Development of Broiler Chicks. *ASAP Animal Production*. Pobrano z http://www.asap.asn.au/wp-content/uploads/abstract-2015/150/attach_brief.pdf
22. El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 321–326. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00160-9](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00160-9)
23. Elsheimer-Matulova, M., Varmuzova, K., Kyrova, K., Havlickova, H., Sisak, F., Rahman, M., Rychlik, I. (2015). PhoP, SPI1, SPI2 and aroA mutants of Salmonella Enteritidis induce a different immune response in chickens. *Veterinary Research*, 46(1). <http://doi.org/10.1186/s13567-015-0224-x>
24. Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S. (2006). Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 266–272. <http://doi.org/10.1093/jac/dkl246>
25. Feng, J., Wang, L., Zhou, L., Yang, X., Zhao, X. (2016). Using in vitro immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against salmonella infection in broiler chicks. *PLoS ONE*, 11(1), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147630>
26. Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 9(10), 577–589. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
27. Foye, O. T., Huang, I. F., Chiou, C. C., Walker, W. A., Shi, H. N. (2012). Early administration of probiotic Lactobacillus acidophilus and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(3), 467–480. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00978.x>
28. Freerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., ... Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 289(11), 7884–96. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>
29. Friedman, A. (2008). Oral tolerance in birds and mammals: Digestive tract development determines the strategy. *W Journal of Applied Poultry Research* (T. 17, ss. 168–173). <http://doi.org/10.3382/japr.2007-00099>

30. Friedman, A., Bar-Shira, E., Sklan, D. (2003). Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World's Poultry Science Journal*, 59(2), 209–219. <http://doi.org/10.1079/WPS20030013>
31. Galdeano, C. M., Perdigón, G. (2006). The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(2), 219–226. <http://doi.org/10.1128/CVI.13.2.219-226.2006>
32. Hao, W.-L., Lee, Y.-K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 268(3), 491–502. <http://doi.org/10.1385/1-59259-766-1:491>
33. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis In'T Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00044-0](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00044-0)
34. Huang, D. W., Lempicki, R. a, Sherman, B. T. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
35. Huang, D. W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1–13. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
36. Huttenhower, C., Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–14. <http://doi.org/10.1038/nature11234>
37. Inoue, R., Otsuka, M., Ushida, K. (2005). Development of Intestinal Microbiota in Mice and Its Possible Interaction with the Evolution of Luminal IgA in the Intestine. *Experimental Animals*, 54(5), 437–445. <http://doi.org/10.1538/expanim.54.437>
38. Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2 Suppl), 444S–450S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157355>
39. Iyer, C., Kusters, A., Sethi, G., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, B. B., Versalovic, J. (2008). Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signalling. *Cellular Microbiology*, 10(7), 1442–1452. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x>
40. Jensen, H., Drømtorp, S. M., Axelsson, L., Grimmer, S. (2015). Immunomodulation of Monocytes by Probiotic and Selected Lactic Acid Bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(1), 14–23. <http://doi.org/10.1007/s12602-014-9174-2>
41. Jeong, J. H. ye, Jang, S., Jung, B. J. un, Jang, K. S., Kim, B. G., Chung, D. K. yun, Kim, H. (2015). Differential immune-stimulatory

- effects of LTAs from different lactic acid bacteria via MAPK signaling pathway in RAW 264.7 cells. *Immunobiology*, 220(4), 460–466. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.11.002>
42. Jung, S. J., Houde, R., Baurhoo, B., Zhao, X., Lee, B. H. (2008). Effects of Galacto-Oligosaccharides and a Bifidobacteria lactis-Based Probiotic Strain on the Growth Performance and Fecal Microflora of Broiler Chickens. *Poultry Science*, 87(9), 1694–1699. <http://doi.org/10.3382/ps.2007-00489>
 43. Kaji, R., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Nanno, M., Shida, K. (2010). Bacterial Teichoic Acids Reverse Predominant IL-12 Production Induced by Certain Lactobacillus Strains into Predominant IL-10 Production via TLR2-Dependent ERK Activation in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3505–3513. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0901569>
 44. Kajiwara, E., Shigeta, A., Horiuchi, H., Matsuda, H., Furusawa, S. (2003). Development of Peyer's patch and cecal tonsil in gut-associated lymphoid tissues in the chicken embryo. *The Journal of veterinary medical science*, 65(5), 607–14. [Pobrano z http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808213](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808213)
 45. KANNAKI, T. R., REDDY, M. R., SHANMUGAM, M., VERMA, P. C., SHARMA, R. P. (2010). Chicken toll-like receptors and their role in immunity. *World's Poultry Science Journal*, 66(4), 727–738. <http://doi.org/10.1017/S0043933910000693>
 46. Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., Jeffrey, I. (2012). Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. *Nature*, 474(7351), 327–336. <http://doi.org/10.1038/nature10213>. Human
 47. Keestra, A. M., de Zoete, M. R., Bouwman, L. I., Vaezirad, M. M., van Putten, J. P. M. (2013). Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental Comparative Immunology*, 41(3), 316–323. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.009>
 48. Kim, Y.-G., Ohta, T., Takahashi, T., Kushiro, A., Nomoto, K., Yokokura, T., ... Danbara, H. (2006). Probiotic Lactobacillus casei activates innate immunity via NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 8(4), 994–1005. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.019>
 49. Klasing, K. C. (2007). Nutrition and the immune system. *British Poultry Science*, 48(5), 525–537. <http://doi.org/10.1080/00071660701671336>
 50. Koenen, M. E., Boonstra-Blom, A. G., Jeurissen, S. H. M. (2002). Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89(1–2), 47–56. [http://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00169-1](http://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00169-1)

51. Kramer, P. A., Ravi, S., Chacko, B., Johnson, M. S., Darley-Usmar, V. M. (2014). A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biology*, 2, 206–210. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.026>
52. Kuhn, K. A., Stappenbeck, T. S. (2013). Peripheral education of the immune system by the colonic microbiota. *Seminars in Immunology*. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.002>
53. Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., ... Yadav, H. (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *International journal of food sciences and nutrition*, 61(5), 473–96. <http://doi.org/10.3109/09637480903455971>
54. Latvala, S., Pietilä, T. E., Veckman, V., Kekkonen, R. A., Tynkkynen, S., Korpela, R., Julkunen, I. (2008). Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World Journal of Gastroenterology*, 14(36), 5570–5583. <http://doi.org/10.3748/wjg.14.5570>
55. Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 171–184. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2297>
56. LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., ... Sesma, F. (2011). B-group vitamin production by lactic acid bacteria--current knowledge and potential applications. *Journal of applied microbiology*, 111(6), 1297–309. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
57. LEDERBERG, J., MCCRAY, A. T. (2001). 'Ome Sweet 'Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8–8. Pobrano z <http://go.galegroup.com/ps/anonymou?p=AONEisw=wiissn=08903670iv=2.1iit=riid=GALE%7CA73535513isid=googleScholarilinkaccess=fulltextiauthCount=1iisAnonymousEntry=true>
58. Leshchinsky, T. V., Klasing, K. C. (2001). Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Developmental and comparative immunology*, 25(7), 629–38. Pobrano z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472784>
59. Lillehoj, H. S., Trout, J. M. (1996). Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to Eimeria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*.
60. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

61. Lundin, A., Bok, C. M., Aronsson, L., Björkholm, B., Gustafsson, J. Å., Pott, S., ... Pettersson, S. (2008). Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: A tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cellular Microbiology*, 10(5), 1093–1103. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01108.x>
62. Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., ... Wei, F. (2015). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research*, 4(31370903), 1–13. <http://doi.org/10.12688/f1000research.7010.1>
63. Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *The Western journal of medicine*, 171(3), 187–91. Pobrano z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18751183>
64. Macpherson, A. J., Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 4(6), 478–485. <http://doi.org/10.1038/nri1373>
65. Madej, J. P., Bednarczyk, M. (2016). Effect of *in ovo*- delivered prebiotics and synbiotics on the morphology and specific immune cell composition in the gut-associated lymphoid tissue. *Poultry Science*, 95(1), 19–29. <http://doi.org/10.3382/ps/pev291>
66. Mariman, R., Kremer, B., Koning, F., Nagelkerken, L. (2014). The probiotic mixture VSL#3 mediates both pro- and anti-inflammatory responses in bone marrow-derived dendritic cells from C57BL/6 and BALB/c mice. *The British journal of nutrition*, 112(7), 1088–97. <http://doi.org/10.1017/S000711451400169X>
67. Mei, H.-C., Liu, Y.-W., Chiang, Y.-C., Chao, S.-H., Mei, N.-W., Liu, Y.-W., Tsai, Y.-C. (2013). Immunomodulatory Activity of *Lactococcus lactis* A17 from Taiwan Fermented Cabbage in OVA-Sensitized BALB/c Mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 287803. <http://doi.org/10.1155/2013/287803>
68. Meijerink, M., van Hemert, S., Taverne, N., Wels, M., de Vos, P., Bron, P. A., ... Wells, J. M. (2010). Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS One*, 5(5), e10632. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010632>
69. Midilli, M., Alp, M., Kocabağlı, N., Muğlali, Ö. H., Turan, N., Yilmaz, H., Çakır, S. (2008). Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. *South African Journal of Animal Sciences*, 38(1), 21–27. <http://doi.org/10.4314/sajas.v38i1.4104>

70. Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., Natarajan, A. (1995). Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British poultry science*, 36(5), 799–803. <http://doi.org/10.1080/00071669508417824>
71. Nomura, M., Kobayashi, M., Ohmomo, S., Okamoto, T. (2000). Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Appl Environ Microbiol*, 66(5), 2235–2237.
72. NURMI, E., RANTALA, M. (1973). New Aspects of Salmonella Infection in Broiler Production. *Nature*, 241(5386), 210–211. <http://doi.org/10.1038/241210a0>
73. Ohimain, E. I., Ofongo, R. T. S. (2012). The Effect of Probiotic and Prebiotic Feed Supplementation on Chicken Health and Gut Microflora: A Review. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(2), 135–143.
74. Oliveros, J. C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Pabrano z <http://bioinfogp.cnnb.csic.es/tools/venny/index.html>
75. Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., ... Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 489–93. <http://doi.org/10.1126/science.1219328>
76. Pabst, O., Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–239. <http://doi.org/10.1038/mi.2012.4>
77. Parsons, A. H. (1982). Structure of the Eggshell. *Poultry Science*, 61, 2013–2021. <http://doi.org/10.3382/ps.0612013>
78. Patterson, J. a, Burkholder, K. M. (2003a). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry science*, 82(4), 627–631. http://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9_30
79. Patterson, J., Burkholder, K. (2003b). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627–631. <http://doi.org/10.1093/ps/82.4.627>
80. Pedrosa, A. A. (2009). Which came first: the egg or its microbiota?, (706), 542–1904. Pabrano z http://vet.uga.edu/images/uploads/pdrc/PIP_Jul-Aug_09.pdf
81. Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N. (1995). Immune System Stimulation by Probiotics. *Journal of Dairy Science*, 78(7), 1597–1606. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76784-4](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76784-4)
82. Perdígón, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J. C., Medici, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(n4s), S21–S26. <http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601658>
83. Pereira, D. I. A., McCartney, A. L., Gibson, G. R. (2003). An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering

- properties. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4743–52. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4743-4752.2003>
84. Piray, A. H., Kermanshahi, H., Tahmasbi, A. M., Bahrapour, J. (2007). Effects of Cecal Cultures and *Aspergillus* Meal Prebiotic (Fermacto) on Growth Performance and Organ Weights of Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science*, 6(5), 340–344. <http://doi.org/10.3923/ijps.2007.340.344>
 85. Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Fontana, L., Gil, A. (2014). Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15632–15649. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15632>
 86. Resta-Lenert, S., Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52(7), 988–97. <http://doi.org/10.1136/gut.52.7.988>
 87. Ross, E., Köthe, J., Naumann, R., Fischer, W., Mayer, W.-D., Wieland, G., ... Wilson, C. M. (2000). Indicator Reagents. W *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA. http://doi.org/10.1002/14356007.a14_127
 88. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
 89. Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., ... Quackenbush, J. (2003). TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34(2), 374–378. <http://doi.org/10.1006/biot.2003.2559>
 90. Sanders, K., Moran, Z., Shi, Z., Paul, R., Greenlee, H. (2016). Natural Products for Cancer Prevention: Clinical Update 2016. *Seminars in oncology nursing*, 32(3), 215–40. <http://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.06.001>
 91. Savage, D. C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual review of microbiology*, 31(1), 107–33. <http://doi.org/10.1002/9780470281840>
 92. Searle, L. E. J., Best, A., Nunez, A., Salguero, F. J., Johnson, L., Weyer, U., ... La Ragione, R. M. (2009). A mixture containing galactooligosaccharide, produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *Journal of medical microbiology*, 58(Pt 1), 37–48. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.004390-0>
 93. Sekirov, I., Russell, S., Antunes, L. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904.

- <http://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
94. Sevane, N., Bialade, F., Velasco, S., Rebolé, A., Rodríguez, M. L., Ortiz, L. T., ... Dunner, S. (2014). Dietary inulin supplementation modifies significantly the liver transcriptomic profile of broiler chickens. *PLoS ONE*, 9(6).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098942>
 95. Shapiro, H., Lutaty, A., Ariel, A., Shapiro, H., Lutaty, A., Ariel, A. (2011). Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism. *The Scientific World JOURNAL*, 11, 2509–2529.
<http://doi.org/10.1100/2011/397971>
 96. Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Kaji, R., Nagaoka, M., Nanno, M. (2009). Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology*, 128(1 PART 2). <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03095.x>
 97. Sławińska, A., Siwek, M., Zylińska, J., Bardowski, J., Brzezińska, J., Gulewicz, K. A., Nowak, M., Urbanowski, M., Płowiec, A., Bednarczyk, M. F. (2014). Influence of synbiotics delivered in ovo on immune organs development and structure. *Folia Biologica (Poland)*, 62(3), 277–285. http://doi.org/10.3409/fb62_3.277
 98. Sławińska, A., Siwek, M. Z., Bednarczyk, M. F. (2014). Effects of synbiotics injected in ovo on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 75(11), 997–1003. <http://doi.org/10.2460/ajvr.75.11.997>
 99. Sławińska, A., Siwek, M., Bednarczyk, M. (2016). In vitro screening of immunomodulatory properties of synbiotics in chicken DT40 cell line*. *Animal Science Papers and Reports*, 34(1), 81–94. Smith, A. L., Powers, C., Beal, R. K. (2013). The Avian Enteric Immune System in Health and Disease. W *Avian Immunology: Second Edition* (ss. 227–250). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00013-3>
 100. Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., ... Garrett, W. S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573. <http://doi.org/10.1126/science.1241165>
 101. Sun, J., Shi, Y. H., Le, G. W., Ma, X. Y. (2005). Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World Journal of Gastroenterology*, 11(40), 6330–6337. <http://doi.org/10.3748/wjg.v11.i40.6330>
 102. Tang, S. G. H., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Saad, W. Z., Yong, S. T., Wong, H. K., Ho, Y. W. (2015). Chemical Compositions of Egg Yolks and Egg Quality of Laying Hens Fed Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Diets. *Journal of Food Science*, 80(8), C1686–C1695. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.12947>

103. Tiihonen, K., Ouwehand, A. C., Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.004>
104. Timmerman, H. M., Veldman, A., van den Elsen, E., Rombouts, F. M., Beynen, A. C. (2006). Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented with Chicken-Specific Probiotics. *Poultry Science*, 85(8), 1383–1388
<http://doi.org/10.1093/ps/85.8.1383>
105. Tsai, W. T., Yang, J. M., Lai, C. W., Cheng, Y. H., Lin, C. C., Yeh, C. W. (2006). Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource Technology*, 97(3), 488–493.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.050>
106. Turnbaugh, P. J., Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of physiology*, 587(Pt 17), 4153–8. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
107. Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gee, J. M., Gibson, G. R. (2005). A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *J. Nutr.*, 135(7), 1726–1731.
<http://doi.org/10.1093/jn/135/7/1726> [pii]
108. Van Der Most, P. J., De Jong, B., Parmentier, H. K., Verhulst, S. (2011). Trade-off between growth and immune function: A meta-analysis of selection experiments. *Functional Ecology*, 25(1), 74–80.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01800.x>
109. Van Dijk, A., Van Eldik, M., Veldhuizen, E. J. A., Tjeerdsmā-Van Bokhoven, H. L. M., De Zoete, M. R., Bikker, F. J., Haagsman, H. P. (2016). Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of chicken cathelicidin-2 derived peptides. *PLoS ONE*, 11(2).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147919>
110. Wachi, S., Kanmani, P., Tomosada, Y., Kobayashi, H., Yuri, T., Egusa, S., Shimazu, T., Suda, Y., Aso, H., Sugawara, M., Saito, T., Mishima, T., Villena, J., Kitazawa, H. (2014). Lactobacillus delbrueckii TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic Escherichia coli-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(10), 2080–2093.
<http://doi.org/10.1002/mnfr.201400218>

111. Wang, S., Hibberd, M. L., Pettersson, S., Lee, Y. K. (2014). *Enterococcus faecalis* from healthy infants modulates inflammation through MAPK signaling pathways. *PLoS ONE*, 9(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097523>
112. Yanagihara, S., Goto, H., Hirota, T., Fukuda, S., Ohno, H., Yamamoto, N. (2014). *Lactobacillus acidophilus* L-92 Cells Activate Expression of Immunomodulatory Genes in THP-1 Cells. *Bioscience of microbiota, food and health*, 33(4), 157–64. <http://doi.org/10.12938/bmfh.33.157>
113. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
114. Yeganegi, M., Leung, C. G., Martins, A., Kim, S. O., Reid, G., Challis, J. R. G., Bocking, A. D. (2010). *Lactobacillus rhamnosus* GR-1-induced IL-10 production in human placental trophoblast cells involves activation of JAK/STAT and MAPK pathways. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 17(11), 1043–1051. <http://doi.org/10.1177/1933719110377237>
115. Yitbarek, A., Echeverry, H., Munyaka, P., Rodriguez-Lecompte, J. C. (2015). Innate immune response of pullets fed diets supplemented with prebiotics and synbiotics. *Poultry Science*, 94, 1802–1811. <http://doi.org/10.3382/ps/pev147>
116. Zelaya, H., Villena, J., Lopez, A. G., Alvarez, S., Ag??ero, G. (2014). Modulation of the inflammation-coagulation interaction during pneumococcal pneumonia by immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505: Role of Toll-like receptor 2. *Microbiology and Immunology*, 58(7), 416–426. <http://doi.org/10.1111/1348-0421.12163>
117. Zhao, Y. H., Chi, Y. J. (2009). Characterization of collagen from eggshell membrane. *Biotechnology*, 8(2), 254–258. <http://doi.org/10.3923/biotech.2009.254.258>

STRESZCZENIE

Celem badań przedstawionych w niniejszej dysertacji było określenie wpływu substancji prebiotycznych oraz synbiotycznych podanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju zarodkowego, na poziom ekspresji genów kurcząt brojlerów.

W tym celu zaprojektowano doświadczenie składające się z trzech etapów:

1. badania *in vitro*, które pozwoliły sprawdzić czy różne probiotyczne szczepy bakteryjne wykazują zróżnicowany potencjał do immunostymulacji komórek gospodarza;
2. badania na embrionach, które pozwoliły ustalić czy prebiotyk i bakterie probiotyczne podane *in ovo* do komory powietrznej jaja przenikają przez błonę podskorupową do wnętrza jaja;
3. badania *in vivo*, które pozwoliły określić jak zmienia się ekspresja genów związanych z układem immunologicznym po podaniu *in ovo* prebiotyku i synbiotyku w czasie życia broilerów.

W badaniach *in vitro* jako model doświadczalny wykorzystano kurzą makrofagopodobną linię komórkową HD11, która przez sześć godzin była inkubowana razem z jednym z czterech szczepów probiotycznych: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036 (**P3**) oraz *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). Po inkubacji wyizolowano RNA, które zostało użyte do wykonania całogenomowej mikromacierzy ekspresyjnej.

W badaniach na embrionach, do jaj w dwunastej dobie inkubacji, podano do komory powietrznej niebieski barwnik (imitujący prebiotyk) lub bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (probiotyk). W kolejnych dniach rozwoju zarodkowego obserwowano migrację barwnika, poprzez otworzenie jaja oraz migrację bakterii, poprzez pobieranie próbek różnych fragmentów jaja, które następnie inkubowano w medium selektywnie namnażającym dla *Lactococcus* (zmętnienie medium oznaczało obecność bakterii w danym fragmencie jaja).

W badaniach *in vivo* do komory powietrznej jaj, w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego, podano w grupie kontrolnej sól fizjologiczną, w grupach eksperymentalnych: inulinę (**P1**), GOS (**P2**), inulinę z *L. lactis* subsp. *lactis* IBB2955 (**S1**) oraz GOS + *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 (**S2**). Po wykluciu pisklęta zostały poddane seksowaniu, a następnie kogutki o masie około 42g pozostawiono do dalszego odchowu. Ptaki utrzymywano na ściółce

i żywiono *ad libitum* zgodnie z trzy-fazowym programem żywienia dla broilerów Ross. Zwierzęta były karmione standardowymi paszami handlowymi otrzymanymi z Agrocentrum (Kałęczyn): starter (dzień 1 do 14), grower (dzień 15 do 30) i finisz (dzień 31 do 34). W 1-szym, 14-stym i 35-tym dniu życia pobrano od pięciu osobników z każdej grupy: śledzionę, migdałki jelit ślepych i fragment jelita grubego. Próbkę natychmiast zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C. Z tkanek wyizolowano RNA, które posłużyło do względnej analizy ekspresji genów, a dla tkanek pochodzących od ptaków w 35 dniu życia wykonano analizę transkryptomu przy użyciu całogenomowej mikromacierzy ekspresyjnej.

Badania *in vitro* wykazały, iż zastosowane szczepy probiotyczne spowodowały duże zmiany w ekspresji genów linii komórkowej HD11. Zaobserwowane zmiany świadczą o silnej immunostymulacji i aktywacji reakcji prozapalnej, przy czym w grupach P1, P2, i P4 zmiany w ekspresji genów były zbliżone do siebie. W grupie P3 liczba genów o zmienionej ekspresji była znacznie mniejsza, a krotność zmian niższa, co świadczy iż różne szczepy probiotyczne mogą wywoływać odmienną odpowiedź immunologiczną.

W badaniach na embrionach zaobserwowano iż niebieski barwnik (imitujący prebiotyk) zaczyna przenikać z komory powietrznej do wnętrza jaja po dwóch dniach od podania. Przenikanie jest powolne i ciągłe, przez co prebiotyk dostaje się do embrionu w sposób powolny od podania do wylęgu. Bakterie probiotyczne natomiast pozostają w komorze powietrznej do momentu lęgu.

Badania *in vivo* wykazały, iż najsilniejsze zmiany (spadek) w ekspresji genów związanych z układem immunologicznym następuje w 35. dobie życia broilerów. Analiza transkryptomu dla tego punktu czasowego wykazała iż najwięcej zmian wywołał GOS (P2) w migdałkach jelit ślepych. Najmniej zmian obserwowano dla jelita grubego. Analiza podobieństw pomiędzy grupami wykazała iż tylko niewielka liczba genów o zmienionej ekspresji jest wspólna między grupami, co więcej podobieństw tych jest też niewiele pomiędzy prebiotykiem, a synbiotykiem zawierającym ten sam związek bioaktywny. Procesy biologiczne, których ekspresja uległa zmianie po podaniu *in ovo* P2 w migdałkach jelit ślepych, były związane głównie: z odpowiedzią na stres (25%), produkcją cytokin (18%), metabolizmem (10%), odpowiedzią immunologiczną (10%), metabolizmem białek (7%), pozostała część procesów biologicznych była związane z różnymi funkcjami układu immunologicznego.

SUMMARY

The purpose of the study presented in this dissertation was to determine the effects of prebiotic and synbiotic delivered *in ovo* on the 12th day of embryonic development on the gene expression level of the broiler chickens.

A three stage experiment was designed:

1. In vitro studies that have shown that different probiotic bacterial strains exhibit differentiated potentials for immunostimulation of host cells;
2. Tests on embryos that have determined whether the probiotic and probiotic bacteria injected *in ovo* to the air chamber of the egg penetrate the eggshell into the egg;
3. In vivo studies that have determined how the expression of immune-related genes during broiler's life span is changed due to prebiotics and synbiotics administration *in ovo*.

In vitro experiment was based on chicken macrophage-like cell line HD11, which was incubated for six hours with one of four probiotic strains: *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* IBB 477 (**P1**), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB 2955 (**P2**), *Lactobacillus Plantarum* IBB 3036 (**P3**) and *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 (**P4**). After incubation, a RNA was isolated for the whole genome microarrays analysis.

In the embryo test, eggs on the 12 day of incubation were injected with a blue dye (imitating a prebiotic) or *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB 477 (probiotic). In the following days of embryo development, dye migration and bacterial migration were observed by picking samples of various egg samples which were subsequently incubated in a lactococcus selective medium.

In vivo test was based on the *in ovo* injection on the 12 day of incubation one the following substances: saline (**P1**), GOS (**P2**), inulin with *L. lactis* subsp *lactis* IBB2955 (S1) or GOS + *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 (**S2**). After hatching, the chicks were sexed and then the cockers weighing about 42g were selected for the experiment. Birds were fed ad libitum according to Ross's three-phase feeding program. Feed was obtained from Agrocentrum (Kaleczyn). The standard feeding regime was as follows: starter (day 1 to 14), grower (day 15 to 30) and finisher (day 31 to 34).

On the 1st, 14th, and 35th day of life, five individuals from each group were sacrificed and selected tissues were taken: spleen, cecal tonsils, and large

intestine. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 ° C. RNA was extracted from tissues and subjected to relative gene expression analysis, and to whole transcriptome analysis (day 35th only).

In vitro studies have shown that the probiotic strains caused major changes in gene expression in the HD11 cell line. The observed changes demonstrated strong immunostimulation and activation of the proinflammatory response, in group: P1, P2, and P4. In group P3, the number of genes with altered expression was significantly lower and the fold change was lower, suggesting that different probiotic strains may produce a different immune response.

Embryonic studies have shown that blue dye (imitating a prebiotic) begins to penetrate from the air chamber into the egg within two days of administration. Penetration is slow and continuous, so that the prebiotic gets to the embryo in a slow doses. Probiotic stays in the air chamber until hatch.

In vivo studies have shown that the strongest changes (downregulation) in gene expression of genes associated with the immune system occur on the 35th day of life. Whole transcriptome analysis at this time point revealed that most of the changes are induced by GOS (**P2**) in the cecal tonsils. The lowest number of changes in gene expression was observed in the large intestine. Similarity analysis between the experimental groups showed that only a small number of genes with altered expression is common between groups. Moreover there is low level of similarity between the prebiotic and the synbiotic which contains the same prebiotic. Biological processes that have been altered by P2 in the tonsils were mainly related to: response to stress (25%), cytokine production (18%), metabolism (10%), immune response (10%), protein metabolism (7%), the remaining part of biological processes was associated with various functions of the immune system.