

**ARKADIUSZ PŁOWIEC**

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

### **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 makroflagopodobną 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 bobieranie próbek różnych fragmentów jaja,

które następnie inkubowano w medium selektywnie namnażającym dla lactococcusów (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 Agrocetrum (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 35<sup>th</sup> 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.