

Dr inż. Anna Sławińska

Autoreferat

**Opis dorobku i osiągnięć
naukowych**

dr inż. Anna Sławińska
2016-12-13

Spis treści

1. Życiorys naukowy.....	2
2. Główne kierunki badań.....	3
2.1. Analizę mechanizmów biologicznych z wykorzystaniem technik molekularnych	3
2.2. Modulację cech fenotypowych metodami biotechnologicznymi	3
2.3. Określenie interakcji międzykomórkowych w odpowiedzi na czynniki środowiskowe..	3
3. Szczególne osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym.....	4
3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
3.2. Publikacje wchodzące w skład szczególnego osiągnięcia (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).....	4
3.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	12
4.1. Analiza molekularna zróżnicowania genetycznego różnych populacji drobiu	12
4.2 Identyfikacja podłoża genetycznego cech ilościowych u zwierząt.....	13
4.3. Stymulacja miogenezy u kurcząt poprzez modulację termiczną i naświetlanie	16
4.4. Długofalowe efekty podania prebiotyku i synbiotyku <i>in ovo</i>	17
4.4. Modele <i>in vitro</i> do oceny efektów wpływu środowiska na procesy biologiczne	18
5. Literatura	19

1. Życiorys naukowy

1.1. Imię i nazwisko

Anna Sławińska

1.2. Data i miejsce urodzenia

24 maja 1980 w Kętrzynie

1.3. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- **Stopień naukowy doktora:** Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika, specjalność: biotechnologia, uzyskany 3 lipca 2009 roku. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania nad genetycznymi podstawami odporności u kur”. promotor prof. dr hab. inż. Marek Bednarczyk, Rozprawa doktorska wyróżniona.
- **Tytuł zawodowy magistra inżyniera:** Akademia Techniczno – Rolnicza im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Rolniczy, kierunek: biotechnologia, tytuł zawodowy magistra inżyniera, uzyskany 24 czerwca 2004 roku, „Analiza zróżnicowania genetycznego gęsi z wykorzystaniem metody RAPD-PCR” Promotor prof. dr hab. inż. Marek Bednarczyk.

1.4. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **Marzec 2010 do chwili obecnej** – Adiunkt, Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Pracownia Genomiki.
- **Kwiecień 2010 – Luty 2011** – Konsultant, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory w Seibersdorf (Austria).
- **Luty 2008 – Luty 2010** – Pracownik techniczny, Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Laboratorium Wydziałowe.

2. Główne kierunki badań

Głównym kierunkiem moich prac badawczych jest wykorzystanie biotechnologicznych metod kształtowania fenotypu kurcząt. Fenotyp (F) jest wypadkową wpływu genotypu (G) i środowiska (Ś), zgodnie z formułą: $F = G + \dot{S}$. W związku z tym, poprawa cech fenotypowych kurcząt może odbywać się na drodze selekcji w oparciu o korzystne warianty genetyczne, bądź poprzez modyfikacje środowiskowe. Badania z zakresu genetycznych podstaw odporności u kurcząt (opisane w rozdziale 4. Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze) wykazały niską odziedziczalność takich cech, jak humoralna odpowiedź immunologiczna. Z tego względu, szczególne osiągnięcie naukowe, prezentowane w niniejszym Autoreferacie, oparte jest na zastosowaniu narzędzi biotechnologicznych na poziomie rozwoju embrionalnego kurcząt do poprawy ich cech fenotypowych. Główne kierunki badań, ujęte w szczególnym osiągnięciu obejmują:

2.1. Analizę mechanizmów biologicznych z wykorzystaniem technik molekularnych

- Regulacja ekspresji genów związanych z układem immunologicznym u kurcząt, na skutek podania prebiotyku lub synbiotyku *in ovo*;
- Kształtowanie tolerancji układu immunologicznego w trakcie życia osobniczego kurcząt na skutek stymulacji mikrobiomu w okresie embrionalnym;

2.2. Modulację cech fenotypowych metodami biotechnologicznymi

- Wpływ iniekcji prebiotyku lub synbiotyku *in ovo* na rozwój głównych narządów układu limfatycznego kurcząt;

2.3. Określenie interakcji międzykomórkowych w odpowiedzi na czynniki środowiskowe

- Wykorzystanie kurczącej linii komórkowej DT40 jako modelu biologicznego do testowania immunomodulujących właściwości prebiotyków i probiotyków *in vitro*.

3. Szczególne osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Biotechnologia *in ovo* – wpływ prebiotyków i synbiotyków podanych w okresie embrionalnym na modulację ekspresji genów u kurcząt”

3.2. Publikacje wchodzące w skład szczególnego osiągnięcia (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Sławińska A.**, D'Andrea M., Pilla F., Bednarczyk M., Siwek M. Expression profiles of Toll-like receptors 1, 2 and 5 in selected organs of commercial and indigenous chickens. *J Appl Genet* (2013) 54:489-492. (IF₂₀₁₃ = 1,902; Punkty MNiSW₂₀₁₃ 20)
2. **Sławińska A.**, Siwek M., Bednarczyk M. Effects of synbiotics injected *in ovo* on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am J Vet Res* (2014) 75:997-1003. (IF₂₀₁₄ = 1,335; Punkty MNiSW₂₀₁₄: 30)
3. **Sławińska A.**, Siwek M., Żylińska J., Bardowski J., Brzezińska J., Gulewicz K.A., Nowak M., Urbanowski M., Płowiec A., Bednarczyk M. Influence of synbiotics delivered *in ovo* on immune organs development development and structure. *Folia Biol-Krakow* (2014) 62:277-285. (IF₂₀₁₄ = 0,882; Punkty MNiSW₂₀₁₄: 15)
4. Płowiec A., **Sławińska A.**, Siwek M., Bednarczyk M. Effect of *in ovo* administration of inulin and *Lactococcus lactis* on immune-related gene expression in broiler chickens. *Am J Vet Res* (2015) 76:975-982. (IF₂₀₁₅ = 1,335; Punkty MNiSW₂₀₁₄: 30)
5. **Sławińska A.**, Siwek M., Bednarczyk M. *In vitro* screening of immunomodulatory properties of the synbiotics in chicken DT40 cell line. *Anim Sci Pap Rep* (2016) 34:81-93. (IF₂₀₁₄ = 0,718; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 25)

3.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Kura (*Gallus gallus domesticus*) jest ważnym modelem w badaniach biologicznych i biomedycznych, jak również wiodącym gatunkiem gospodarskim w światowej produkcji żywności. Rozwój embrionalny ptaków odbywa się w jajach, poza organizmem matki. Umożliwia to bezpośrednią manipulację zarodkami kurcząt w celu śledzenia wpływu czynników zastosowanych podczas inkubacji na rozwój zarodka oraz modulację parametrów fenotypowych nowo wylęzonych kurcząt. Rozwój embrionalny kurcząt wynosi 21 dni i jest okresem intensywnego wzrostu zarodka oraz różnicowania komórek. Zmiany, jakie zachodzą w tym czasie rzutują na dalszy rozwój post-embrionalny. Dlatego, zabiegiem korzystnym z punktu widzenia kształtowania cech osobniczych kurcząt jest modulacja środowiska rozwoju zarodka w ten sposób, aby uzyskać pożądany zestaw cech u danego osobnika po wylęgu. Jest to możliwe poprzez rozwój technik *in ovo*, opierających się na zastosowaniu podczas inkubacji jaj dodatkowych czynników (biotycznych lub abiotycznych). W efekcie zastosowania takiej stymulacji na etapie embrionalnym, następujące zmiany są mierzalne podczas rozwoju osobniczego kurcząt. Ostatecznym celem jest otrzymanie produktu końcowego (tj. żywność pochodząca z produkcji drobiarskiej) o określonej jakości. Technologia *in ovo* stanowi więc klasyczne narzędzie biotechnologii, wykorzystywane do pozyskiwania produktów o określonej, poprawionej z punktu widzenia konsumenta, jakości.

Modulacja cech produkcyjnych i immunologicznych kurcząt na poziomie embrionalnym, przebiegała poprzez podanie substancji biologicznie aktywnych (prebiotyki, synbiotyki) *in ovo*. W celu określenia wpływu kolejnych stymulacji na rozwijający się zarodek, prowadzone badania obejmowały wszystkie etapy post-embrionalnego rozwoju kurczęcia. Monitorowanie subtelnych zmian fenotypowych zachodzących podczas rozwoju zarodkowego wymaga zastosowania specyficznych narzędzi badawczych. W badaniach własnych zastosowano technikę RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative PCR*), służącą do określania zmian w ekspresji genów na poziomie mRNA. Metoda ta została wybrana z tego względu, że synteza mRNA jest najbardziej podstawowym fenotypem u zwierząt, stanowiącym matrycę do dalszej biosyntezy białek w komórkach. Na podstawie zróżnicowanej ekspresji genów, kształtowane są indywidualne cechy osobnicze, takie jak masa ciała, czy poziom odpowiedzi immunologicznej. Wykorzystanie technik molekularnych, stanowiących narzędzia współczesnej biotechnologii, umożliwia detekcję podstawowych mechanizmów, które ulegają modulacji pod wpływem cech środowiskowych.

Celem naukowym prowadzonych prac było:

1. Określenie molekularnego wzorca ekspresji receptorów Toll-podobnych u różnych genotypów kurcząt (publikacja 1)
3. Określenie wpływu prebiotyku synbiotyku podanego *in ovo* na ekspresję genów regulujących odpowiedź immunologiczną oraz rozwój układu immunologicznego kurcząt (publikacje 2 i 3)
4. Określenie wpływu stymulacji *in ovo* na różnych etapach rozwoju osobniczego kurcząt (publikacja 4)
5. Opracowanie modelu *in vitro* służącego do analizy immunomodulujących właściwości substancji bioaktywnych (np. synbiotyki) (publikacja 5)

Osiągnięte wyniki:

Publikacja 1

Sławińska A., D'Andrea M., Pilla F., Bednarczyk M., Siwek M. (2013) Expression profiles of Toll-like receptors 1, 2 and 5 in selected organs of commercial and indigenous chickens. *J Appl Genet* 54:489-492.

Odporność u zwierząt jest warunkowana mechanizmami rozpoznawania czynników immunogennych, takich jak bakterie, wirusy, czy pasożyty, i uruchamianiu odpowiedniej odpowiedzi bądź tolerancji immunologicznej. Jednym z konserwatywnych mechanizmów rozpoznawania patogenów u zwierząt jest obecność receptorów Toll-podobnych (ang. TLR – *Toll-like receptors*) na powierzchni błony komórkowej lub w obrębie komórek. Zdolność do rozpoznawania mikroorganizmów w dużej mierze zależy od bazowego stopnia ekspresji genów kodujących TLR. Z tego względu, w badaniach własnych określono stopień ekspresji genów *TLR1*, *TLR2* i *TLR5* w różnych narządach kur o kontrastujących genotypach (selekcjonowane vs. nieselekcjonowane/rodzime). Analizowane TLR odpowiadają za rozpoznawanie bakterii Gram-dodatnich (TLR1/TLR2, np. *Lactococcus* i inne bakterie kwasu mlekowego) oraz bakterii wyposażonej w wici (TLR5, np. *Salmonella*). Różnice między dwoma genotypami dotyczyły między innymi tkanki jelita grubego, w którym wykryto silniejszą ekspresję *TLR1* w selekcjonowanych kurach nieśnych (Hy-line), natomiast wyższą selekcję *TLR5* – w przypadku nieselekcjonowanej, natywnej rasy kur (Zielononózka kuropatwiana). Może świadczyć to o odrębnych mechanizmach odpowiedzi na bakterie kwasu mlekowego, zasiedlające jelito grube, bądź infekcję enteropatogenem – pałeczkami *Salmonella*. W konsekwencji, potwierdzono, że

bakterie – stymulanty receptorów TLR – mogą być wykorzystywane do modulacji funkcji układu immunologicznego kurcząt. W toku dalszych prac badawczych wysunięto hipotezę, że genotyp kurcząt determinuje nie tylko profil ekspresji receptorów TLR ale również odpowiedź na komensalne bakterie układu pokarmowego, stymulowane w sposób bezpośredni (inokulacja probiotycznych szczepów bakteryjnych) oraz w sposób pośredni (podanie prebiotyku o efekcie bifidogennym). Mikroflora jelitowa stymuluje nieswoistą odpowiedź immunologiczną w tkance limfatycznej związanej z jelitami (GALT – *gut associated lymphatic tissue*). Sygnały mikrobiologiczne dochodzące do komórek limfatycznych (monocyty, limfocyty), są przekazywane między innymi za pośrednictwem konserwatywnego szlaku metabolicznego TLR. W związku z tym, ekspresja odpowiednich TLR w układzie pokarmowym kurcząt, warunkuje dalszy prawidłowy rozwój układu immunologicznego, poprzez kontakt z bakteriami przewodu pokarmowego.

Publikacja 2

Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M. (2014) Effects of synbiotics injected *in ovo* on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. Am J Vet Res 75:997-1003.

Publikacja 3

Sławińska A., Siwek M., Żylińska J., Bardowski J., Brzezińska J., Gulewicz K.A., Nowak M., Urbanowski M., Płowiec. A., Bednarczyk M. (2014) Influence of synbiotics delivered *in ovo* on immune organs development development and structure. Folia Biol-Krakow 62:277-285.

Kolejnym etapem prac nad kształtowaniem fenotypu kurcząt poprzez modulację warunkami środowiska w okresie embrionalnym, było podanie *in ovo* prebiotyku i synbiotyku. Preparaty bioaktywne, które zostały wykorzystane w w/w pracach doświadczalnych, zostały podane do komory powietrznej jaja w 12. dobie inkubacji. Składały się one z: prebiotyku (ORR) oraz dwóch różnych synbiotyków (ORR + *L. lactis* subsp. *lactis* oraz ORR + *L. lactis* subsp. *cremoris*). Efekty stymulacji były oceniane u 42-dniowych kurcząt brojlerów na dwóch poziomach: molekularnym (**publikacja 2**) i anatomicznym (**publikacja 3**). Analiza molekularna przeprowadzona na próbach pobranych ze śledziony i migdałków jelit ślepych kurcząt, którym podano synbiotyk, *in ovo* wykazała modulację profilu ekspresji genów najważniejszych cytokin (*IL-4*, *IL-6*, *IL-12p40*, *IL-18* oraz *IFN-γ*) i chemokin (*IL-8*) w narządach odpowiadających za lokalną (migdałki jelit ślepych) i systemową (śledziona) odpowiedź immunologiczną. W kontekście aktywacji genów immunologicznie czynnych,

dowodzono, że ekspresja genów cytokin i chemokin uległa zahamowaniu w migdałkach jelit ślepych, natomiast aktywacji w śledzionie. W konsekwencji – kurczęta, które otrzymały synbiotyki *in ovo* w okresie embrionalnym, wykazały potencjał do rozwoju silniejszej tolerancji ze strony układu immunologicznego, w porównaniu do grup kontrolnych. Zmiany na poziomie molekularnym po podaniu synbiotyku *in ovo* niosły za sobą również poprawę parametrów makroskopowych i mikroskopowych organów limfatycznych. Przejawiającą się (1) zwiększonym indeksem śledziony, (2) większą ilością tymocytów w grasicy oraz (3) większym indeksem bursy Fabrycjusza. W efekcie udowodniono, że modyfikacje zarodka kury za pośrednictwem biotechnologii *in ovo* mają silny efekt na modulację ekspresji genów u osobników dorosłych, oraz wpływają na poprawę parametrów układu immunologicznego.

Publikacja 4

Płowiec A., Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M. Effect of *in ovo* administration of inulin and *Lactococcus lactis* on immune-related gene expression in broiler chickens. Am J Vet Res (2015) 76:975-982.

Kolejnym pytaniem badawczym, związanym z wyjaśnieniem mechanizmu działania prebiotyku i synbiotyku podanego *in ovo* była odpowiedź na pytanie: w jakim momencie życia osobniczego można spodziewać się najsilniejszych efektów stymulacji zastosowanej w okresie embrionalnym? Prebiotyk (inulina) i synbiotyk (inulina w połączeniu z *L. lactis* subsp. *lactis*) podano *in ovo*, w 12 dobie inkubacji jaj. Po wylęgu przeprowadzono odchow kurcząt, podczas którego pobrano próby śledziony oraz migdałków ślepych w 1 dobie, 14 dobie oraz 35 dobie po wylęgu. W tkankach oznaczono poziom mRNA najważniejszych cytokin (*IL-4*, *IL-6*, *IL-12p40*, *IL-18*, *CD80*, *IFN-β* oraz *IFN-γ*) i chemokin (*IL-8*). Analiza ta pozwoliła na wyciągnięcie szeregu wniosków: (1) efekt iniekcji *in ovo* zwiększa się z wiekiem osobnika, (2) ekspresja genów cytokin i chemokin ma tendencję spadkową, pogłębiającą się wraz z wiekiem zwierząt (3) najważniejszym organem wchodzącym w interakcje z mikrobiomem są migdałki jelit ślepych (fragment GALT). Może to wskazywać na kształtowanie się tolerancji ze strony układu immunologicznego na skutek wczesnego rozwoju mikroflory jelitowej i jest zjawiskiem niezwykle korzystnym z punktu widzenia praktyki produkcyjnej.

Publikacja 5

Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M. *In vitro* screening of immunomodulatory properties of the synbiotics in chicken DT40 cell line. Anim Sci Pap Rep (2015) 34:81-93.

Substancje bioaktywne, takie jak prebiotyki i probiotyki, wykazują różne mechanizmy działania; prebiotyki stymulują rozwój bakterii jelitowych poprzez dostarczanie substratu do

fermentacji, natomiast probiotyki bezpośrednio zasiedlają ściany jelit. Ich korzystne działanie na organizm może być spotęgowane, gdy dobrana kombinacja prebiotyku z probiotykiem wykazuje synergistyczną interakcję w porównaniu do obu komponentów podanych osobno. Efekty podania konkretnych synbiotyków mogą być ustalone jedynie doświadczalnie, a ze względu na potencjalnie nieograniczoną liczbę dostępnych kombinacji, potrzebne jest opracowanie przesiewowych metod testowania, z wykorzystaniem technik *in vitro*. W badaniach własnych, do tego celu wykorzystano linię komórkową DT40, składającą się z unieśmiertelnionych limfocytów B kury. Limfocyty B stanowią istotną frakcję komórek limfatycznych, należących do komórek prezentujących antygen. Większa część układu immunologicznego jest zlokalizowana w obrębie jelit, w skupiskach limfatycznych określanych jako GALT. Dojrzewanie GALT polega na wzroście tolerancji korzystnej mikroflory jelitowej oraz zwalczaniu patogenów jelitowych. Ma to miejsce podczas kolonizacji jelit przez mikroorganizmy. W przypadku kurcząt, proces ten zachodzi w pierwszych godzinach po wylęgu, podczas kontaktu piskląt ze ściółką. Intensyfikacja hodowli drobiu wymagała zwiększenia biobezpieczeństwa na fermach, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania chorób zakaźnych w wielkotowarowych stadach. Doprowadziło to do znacznej sterylizacji środowiska życia kurcząt, a w konsekwencji do pozbawienia ich naturalnego źródła szczepów bakteryjnych do kolonizacji mikroflory jelitowej, takich jak kontakt z powierzchnią jaja, kwoką, czy ściółką. Z tego względu, konieczne jest wczesne podawanie naturalnych stymulatorów wzrostu, takich jak prebiotyki i probiotyki, bądź ich synergistyczna mieszanina (synbiotyk).

Optimalny dobór tych substancji bioaktywnych jest czynnikiem warunkującym prawidłowy rozwój mikrobiomu, a przez to pośrednio wpływającym na funkcje życiowe gospodarza (m.in. dojrzewanie układu immunologicznego i pokarmowego, przyswajanie składników pokarmowych, ograniczanie enteropatogenów itd.). Jednym z kryteriów selekcji synbiotyków *in vitro* jest zdolność substancji bioaktywnych do interakcji z komórkami gospodarza. W omawianych badaniach, synbiotyki zostały skomponowane w oparciu o trzy prebiotyki: ORR (oligosacharydy z rodziny rafinozy), GOS (galaktooligosacharydy) oraz inulinę i trzy różne szczepy probiotyczne bakterii *Lactococcus lactis*. Analizie poddano poziom ekspresji dwudziestu genów, kodujących panel cytokin i chemokin, genów związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym TLR2 oraz genów związanych z odpowiedzią na kwas teichojowy. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowane zostały dwa synbiotyki o najsilniejszym działaniu immunostymulującym, tj. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + inulina oraz *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* + GOS, które zostały podane do zarodków kurczących in ovo w celu

określenia ich immunomodulujących właściwości na modelu *in vivo* (Sławińska et al., submitted to PLoS One). W efekcie, opracowano platformę *in vitro* do przesiewowych analiz immunostymulujących właściwości synbiotyków, co może być wykorzystywane do opracowywania nowych, korzystnych kombinacji substancji bioaktywnych.

Główne osiągnięcia wynikające z realizacji tych prac oraz **możliwość wykorzystania wyników:**

Opracowanie nowych metod poprawy efektywności i jakości produkcji drobiarskiej jest warunkiem niezbędnym do zapewnienia wystarczającej podaży żywności pochodzenia zwierzęcego dla rosnącej populacji konsumentów. Poprawa genetyczna (zwłaszcza wspomagana selekcją genomową) jest potężnym narzędziem w rękach firm hodowlanych, które wprowadzają na rynek krzyżówki najcenniejszych rodów selekcionowanych. Z tego względu, największy potencjał do poprawy efektów produkcji drobiarskiej oraz jakości wytwarzanej żywności leży w stymulacjach środowiskowych, związanych m.in. z technologią lęgu, żywieniem, suplementacją, immunizacją i dobrostanem. Celem badań własnych, przedstawionych w niniejszym opracowaniu, była ocena efektów manipulacji warunkami środowiska kurcząt (poprzez podawanie prebiotyku i synbiotyku), stosowanych podczas rozwoju embrionalnego. W związku ze specyfiką połączenia dwóch dziedzin; biotechnologii (zarówno w rozumieniu klasycznym, jak i w połączeniu z technikami biologii molekularnej) oraz embriogenezy u kurcząt, prace badawcze prowadzone były pod wspólnym mianownikiem „biotechnologii *in ovo*”.

Podawanie do zarodka kurczęcego mieszaniny prebiotyków i synbiotyków, stanowi nowatorskie podejście do istotnego zagadnienia stymulacji mikroflory jelitowej u nowo wylęzonych piskląt. Inokulacja zarodków substancją bioaktywną w 12 dobie inkubacji jaj jest skorelowane z rozwojem układu pokarmowego i immunologicznego. W 13 dobie, zarodek zaczyna pobierać substancje odżywcze zawarte w jajku drogą pokarmową. W tym samym czasie rozpoczyna się proces zasiedlania bursy Fabrycjusza prekursorami limfocytów B. Podanie w tym momencie prebiotyku, czy synbiotyku *in ovo*, ma na celu zasiedlenia jelit korzystną mikroflorą, a przez to – wspomaganie dojrzewania układu immunologicznego poprzez kontakt z niepatogennym antygenem. Analizy wykonane na poziomie makroskopowym i molekularnym, wyjaśniły mechanizmy związane z reakcją zarodka na zastosowany stymulant. Przede wszystkim, wykazano że kurczęta wolnorosnącej rasy Zielononóżka kuropatwiana, po podaniu synbiotyku miały powiększony indeks śledziony, który jest skorelowany z lepszym

poziomem odpowiedzi immunologicznej. Dalej, na podstawie analiz molekularnych wykazano obniżenie poziomu lokalnej odpowiedzi immunologicznej kurcząt w tkance limfatycznej związanej z jelitami (migdałki jelit ślepych). Wskazuje na możliwość podwyższenia tolerancji pokarmowej u kurcząt, która jest niezwykle istotna z punktu widzenia praktyki produkcyjnej, gdyż prowadzi do redukcji negatywnych skutków nadmiernej odpowiedzi prozapalnej, takich jak cellulitis.

Kolejnym osiągnięciem wynikającym z realizacji prac wchodzących w skład głównego osiągnięcia badawczego, jest odpowiedź na pytanie, czy możliwe jest zbudowanie modelu *in vitro* do testowania kombinacji substancji bioaktywnych, przeznaczonych do podania *in ovo*. W prezentowanej pracy zastosowano model linii komórkowej DT40, wykazując że z punktu widzenia odpowiedzi immunologicznej, istotny jest nie tylko wybór odpowiedniego prebiotyku i probiotyku, jak i ich specyficzne połączenie w synergistyczny produkt. W ten sposób, powstało narzędzie służące do selekcji różnych kombinacji prebiotyków i probiotyków pod względem wpływu na komórki gospodarza *in vitro*. Bezpośrednią implikacją wyników tych badań jest rozwój technik *in vitro*, niewymagających kosztownego testowania substancji bioaktywnych na zwierzętach. Dzięki temu, możliwe jest poszukiwanie nowych synbiotyków o specyficznych właściwościach względem komórek gospodarza (tzw. *designer-synbiotics*), a także próba przewidywania odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza na dany synbiotyk, na podstawie badań *in vitro*.

Prace badawcze opisane powyżej, poza aspektem odkrywczym, stanowią również cenne narzędzie dla praktyki drobiarskiej. Wskazują one na zróżnicowane możliwości związane z zastosowaniem technologii *in ovo* do poprawy parametrów immunologicznych i produkcyjnych kurcząt. Warto podkreślić, że w praktyce hodowlanej, podczas inkubacji jaja nie są poddawane żadnym dodatkowym manipulacjom, za wyjątkiem domięśniowych szczepień przeciwko chorobie Marek'a w 18 dobie inkubacji, stosowanych w niektórych krajach (np. USA). Tym niemniej, zaprezentowane prace wykazały, że manipulacja rozwojem zarodka za pośrednictwem technologii *in ovo*, jest obiecującym narzędziem dla przemysłu drobiarskiego. Podsumowując, biotechnologia *in ovo*, której efekty na poziomie molekularnym zaprezentowano w szczególnym osiągnięciu badawczym, ma silny potencjał kształtowania fenotypu kurcząt za pośrednictwem stymulacji środowiskowych prowadzonych podczas rozwoju embrionalnego.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

4.1. Analiza molekularna zróżnicowania genetycznego różnych populacji drobiu

Badania nad zróżnicowaniem genetycznym drobiu jest jednym z aspektów utrzymania odpowiedniej puli genetycznej zwierząt gospodarskich. Celem konserwacji biologicznej jest nie tylko rozwój genetyczny wysokoprodukcyjnych rodów ale również zachowanie populacji lokalnych, często lepiej przystosowanych do trudnych warunków środowiska. We wczesnych pracach badawczych, badania takie prowadzono na prostych markerach genetycznych, takich jak RAPD (ang. *Random Amplification of Polymorphic DNA*), które nie wymagały znajomości genomu danego gatunku. W badaniach własnych stosując analizy z wykorzystaniem markerów RAPD wykazano m.in. zróżnicowanie genetyczne między czterema rodzimymi rasami gęsi (kartuska, kielecka, lubelska i podkarpaska) utrzymywanych w hodowli zachowawczej prowadzonej w Stacji Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego Instytutu Zootechniki w Dworzyskach (**publikacja 6**). Wykazano podobieństwo genetyczne (wyrażone jako współczynnik wspólnych alleli RAPD) na średnim poziomie 0,638, a rasą o najwyższej odrębności genetycznej, w porównaniu do pozostałych, była gęś kartuska. W dalszych etapach badań, wykonano krzyżowania między rodzimymi rasami gęsi, a komercyjnymi liniami W33 (linia ojcowska) i W11 (linia mateczna), wykorzystywanymi do produkcji komercyjnych mieszańców gęsi kołudzkiej (**publikacja 7**). W efekcie, ujawniono istotny efekt kierunku krzyżowania na zróżnicowanie genetyczne wyrażone współczynnikiem wspólnych alleli RAPD; w przypadku krzyżówek W33♂ x OZ♀ (OZ - rasa zachowawcza), zróżnicowanie genetyczne było na wyższym poziomie (0,59) niż w przypadku odwrotnego kierunku krzyżowania: OZ♂ x W33♀ (0,75). Efekty genetyczne były również poparte wynikami fenotypowymi, zebranymi w trakcie odchovu mieszańców (np. masa ciała, cechy mięsne i reprodukcyjne). Wskazuje to na wpływ chromosomu Z, przenoszonego przez gametę żeńską, w kodowaniu cech fenotypowych. Uzyskane wyniki potwierdziły zasadność ochrony krajowych zasobów genetycznych gęsi, jak również wykorzystania ich w programach hodowlanych.

W Polsce, poza drobiem wodnym, programami ochrony bioróżnorodności genetycznej objętych jest kilkanaście rodzimych ras i rodów kur. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje Zielononóżka kuropatwiana, ze względu na unikalny fenotyp rezedowej barwy skoków oraz zdolność do adaptacji do trudnych warunków środowiska. W badaniach własnych przeprowadzono analizę pochodzenia, pokrewieństwa genetycznego oraz struktury genetycznej

populacji Zielononózki kuropatwianej (ród Zk) utrzymywanej w hodowli zachowawczej *in situ* na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie (**publikacja 19**). Badania te były prowadzone na podstawie sekwencji nukleotydowej DNA mitochondrialnego (pętla D) oraz markerów molekularnych SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*), zawartych w DNA genomowym, genotypowanych przy użyciu całogenomowej technologii SNP-chip (60K SNP Illumina iSelect™ Chicken Microarray). Warto podkreślić, że postęp naukowy, jaki dokonał się w zakresie znajomości genomu kury (**publikacja 10**), pozwolił na rozwój zaawansowanych narzędzi do analiz molekularnych, wykorzystywanych w badaniach własnych. Analiza DNA mitochondrialnego wykazała obecność przynajmniej dwóch niezależnych haplogrup w obrębie populacji Zk, natomiast struktura genetyczna populacji Zk, scharakteryzowana na podstawie DNA genomowego, wykazała domieszkę DNA pochodzącego od ras europejskich (ok. 60%), wschodnioazjatyckich (ok. 35%) oraz południowoazjatyckich (ok. 2%). Tak zróżnicowane podłoże genetyczne Zk (jak również większości innych ras europejskich) ma związek z wyodrębnianiem się ras kur podczas globalnej migracji udomowionego drobiu, towarzyszącej migracjom człowieka, z terenu południowej Azji do Europy. Na podstawie badań genetycznych Zk wykazano również podłoże genetyczne rezedowego ubarwienia skoków, wynikające z obecności alleli recesywnych w *loci* W oraz Id, odpowiedzialnych za wytwarzanie melaniny w skórze i naskórku. Uzyskane wyniki umożliwiają dalsze wykorzystanie Zk jako organizmu modelowego w badaniach genetycznych, zwłaszcza dotyczących dziedziczenia cech w populacjach mieszanych. Podkreślają również zasadność zachowania rodzimych ras zwierząt, jako części dorobku cywilizacyjnego.

Badania molekularne z wykorzystaniem genotypu Zk zostały również prowadzone na modelu chimer ptasich, uzyskanych poprzez wprowadzenie komórek blastodermalnych dawcy (Zk) do zarodka biorcy (Leghorn) (**publikacja 12**). Dzięki wykorzystaniu dwóch odległych genetycznie ras kurcząt, możliwa była identyfikacja chimer przy pomocy markerów mikrosatelitarnych. Chimeryzm był analizowany w gonadach, mięśniu udowym, wątrobie, mięśniu piersiowym oraz sercu. Na podstawie częstotliwości występowania alleli charakterystycznych dla danej rasy, określono średni poziom chimeryzmu na ok. 50%.

4.2 Identyfikacja podłoża genetycznego cech ilościowych u zwierząt

Badania z zakresu genetyki i genomiki gatunków zwierząt gospodarskich mają na celu detekcję genetycznego podłoża ważnych cech gospodarskich. Większość cech produkcyjnych zwierząt to cechy kodowane poligenicznie, przez dużą liczbę genów addytywnych o niskim efekcie. W związku z tym, identyfikacja podłoża genetycznego tych cech najczęściej obejmuje

detekcję regionów chromosomalnych zwanych *loci* cech ilościowych (ang. QTL – *Quantitative Trait Loci*). W tym celu wykorzystuje się trójpokoleniowe populacje eksperymentalne, w których analizuje się dziedziczenie markerów genetycznych i rozkład cech fenotypowych. W badaniach własnych, do analiz immunogenetycznych wykorzystano populację referencyjną kur, powstałą przez skrzyżowanie 5 kogutów pochodzących z rasy White Leghorn poddanej selekcji (WL) z 17 kurami rodzimej rasy Zielononóżka kuropatwiana (Zk). Pokolenia potomne F1 (113 osobników) i F2 (504 osobników) zostały poddane analizie fenotypowej i genotypowej. Analiza fenotypowa polegała na oznaczeniu poziomu naturalnych przeciwciał anty-KLH, anty-LPS oraz anty-LTA (nieswoista odpowiedź immunologiczna), a także pierwotnej odpowiedzi immunologicznej kształtującej się po podaniu antygeny KLH (wyrażonej poziomem przeciwciał anty-KLH). Hemocyjanina KLH pochodzi z małża morskiego *Megathura crenulata* (ang. KLH – *keyhole limpet haemocyanin*) i ma silne działanie immunostymulujące. Lipopolisacharyd (LPS) oraz kwas teichojowy (LTA) stanowią wzorce molekularne związane z patogenami (ang. PAMP – *pathogen associated molecular patterns*), takimi jak bakterie Gram-ujemne (LPS) oraz Gram-dodatnie (LTA). Analiza genotypowa, wykonana dla populacji referencyjnej WL♀ x Zk♂, objęła 30 markerów mikrosatelitarnych, zlokalizowanych w chromosomach: GGA3, GGA5, GGA6, GGA8, GGA9, GGA10, GGA14, GGA15, GGA18 oraz GGAZ. Selekcja markerów mikrosatelitarnych została przeprowadzona na podstawie danych literaturowych zdeponowanych w bazie danych ChickenQTLdb, obejmujących znane QTL dla cech: poziom odpowiedzi immunologicznej anty-KLH, anty-LPS oraz anty-LTA. W oparciu o dane genotypowe i fenotypowe, zebrane dla populacji eksperymentalnej WL♀ x Zk♂, przeprowadzono szereg analiz statystycznych, mających na celu lokalizację QTL, związanych z daną cechą.

W przypadku genetycznych podstaw nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, wyrażonej poziomem naturalnych przeciwciał anty-KLH, anty-LPS i anty-LTA (**publikacja 13**), analizy wykonano przy użyciu modeli statystycznych: regresji (*half-sib* oraz *line-cross*) i LDLA (ang. *linkage disequilibrium linkage analysis*). Przeprowadzone analizy pozwoliły na wytypowanie sześciu *loci* związanych z poziomem naturalnych przeciwciał anty-LPS oraz czterech *loci* związanych z poziomem przeciwciał anty-LTA. Trzy QTL związane z poziomem naturalnych przeciwciał anty-LPS, a dwa z poziomem naturalnych przeciwciał anty-LTA, stanowiły potwierdzenie regionów zidentyfikowanych w innych populacjach referencyjnych. Dla tych regionów genomowych, zawartych w chromosomach: GGA5, GGA6, GGA9, GGA14, GGA18 i GGAZ wykonano analizę genów kandydujących metodą *in silico* (**publikacja 14**). Metoda ta była oparta o bazy danych: NCBI, KEGG, InnateDB oraz

GeneOntology. Geny kandydujące były wytypowane w oparciu o informację pozycyjną (lokalizacja genu w obrębie potwierdzonego regionu QTL) oraz funkcjonalną (udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej). W efekcie, zaproponowano 38 genów kandydujących, biorących udział w: (1) proliferacji, różnicowaniu i funkcji fizjologicznej limfocytów B (np. *CXCL12*, *BLNK*, *IL21R*, *RBP4*, *CD59*, *TNFRSF13B*); (2) szlaku sygnalizacji receptorów TLR (np. *TRAF6*, *FADD*, *NFκBIA*, *CARD11*, *FAS*, *FGF8*, *TGFB*, *IL31RA*) oraz (3) kaskadzie sygnalizacyjnej kinaz MAP (np. *MAP2K3*, *MAP2K4*, *MAP3K1*, *MAP3K13*, *MAPK8IP3*). Uzyskane wyniki dają podstawy poszukiwania mutacji sprawczych w obrębie genów kandydujących.

Region w chromosomie GGA14, zawierający potwierdzony QTL związany z poziomem pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na antygen KLH został również poddany analizom regresji (*half-sib* oraz *line-cross*) i LDLA, a także analizie genów kandydujących (**publikacja 11**). Analizy te wykazały obecność dwóch QTL w chromosomie GGA14, związanych z cechą pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na antygen KLH; jeden na 63 cM, a drugi na 76 cM. W przypadku tego regionu, najbardziej skutecznym modelem statystycznym okazał się model łączony LDLA, w którym wykorzystywana jest informacja o dziedziczeniu cech zarówno ze strony ojca, jak i matki. Model ten umożliwił precyzyjną lokalizację regionu QTL dla odpowiedzi pierwotnej przeciw antygenowi KLH w dystalnej części chromosomu. Dodatkowo, dane genotypowe i fenotypowe dla QTL na GGA14 zostały poddane dodatkowym analizom statystycznym, z wykorzystaniem czterech różnych modeli testujących na obecność dwóch niezależnych QTL w tym samym regionie oraz model zakładający efekt epistazy (**publikacja 15**). Analiza pozycyjnych i funkcjonalnych genów kandydujących wykonana dla tego QTL umożliwiła wytypowanie trzech genów, *AXIN*, *TRAP1* oraz *MAPK8IP3*. Geny te zostały poddane genotypowaniu markerów SNP oraz analizie asocjacji z cechą fenotypową. W rezultacie, dwa markery SNP (RS15012401 i RS15012428) w obrębie genu *AXIN* okazały się istotnie zasocjowane z cechą pierwotnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenowi KLH.

Dane zebrane podczas realizacji prac nad genetycznymi podstawami humoralnej odpowiedzi immunologicznej u kur zostały poddane meta-analizie (analiza na podstawie wyników uzyskanych w różnych projektach) oraz analizie łączonej (ponowna analiza QTL wykonana dla połączonych zbiorów danych z różnych projektów) (**publikacja 17**). Meta analiza QTL umożliwiła zawężenie przedziałów ufności dla dwóch regionów QTL położonych w GGA14 – jednego dla cechy poziomu naturalnych przeciwciał anti-LTA i drugiego – dla cechy pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na antygen KLH. Z kolei analiza łączona

pozwoili na zawężenie przedziału ufności QTL dla cechy odpowiedzi na KLH w GGA14 oraz QTL dla poziomu naturalnych przeciwciał anty-LPS w GGA18. Regiony te zostały wytypowane do analizy asocjacji przeprowadzonej w obrębie genów kandydujących, z wykorzystaniem GoldenGate Genotyping Assay (Illumina) (**publikacja 20**). Wytypowane regiony QTL w chromosomach GGA9, GGA14, GGA18 i GGAZ zawierały łącznie 617 pozycyjnych genów kandydujących oraz 2023 markery SNP. Analiza *in silico* funkcji genów, zawęziła ich liczbę do 36, a liczbę wyselekcjonowanych markerów SNP do 384. Analiza asocjacji przy pomocy dwóch niezależnych modeli statystycznych, RMM i CAR, pozwoliła na wytypowanie najbardziej istotnych SNP dla poszczególnych typów odpowiedzi immunologicznej. Nieswoista odpowiedź humoralna przeciwko LPS była najsilniej zasocjowana z markerami SNP zlokalizowanymi w obrębie genów: *EPHB1* (GGA9), *PRKCB* (GGA14), *FOXJ1* (GGA18) oraz *PTGER4* (GGAZ). Dla odpowiedzi immunologicznej anty-KLH i anty-LTA najsilniejsze asocjacje zostały zidentyfikowane dla SNP w genach *JMJD6* oraz *ITGB4*, zlokalizowanych w GGA18. Markery te zostały zakwalifikowane jako nukleotydy cech ilościowych (ang. QTN – *quantitative trait nucleotide*), które w największym stopniu wpływają na wariację genetyczną warunkującą daną cechę.

Warto wspomnieć, że detekcja QTL przeprowadzona w obrębie populacji referencyjnej zwierząt, musi być poddana weryfikacji w stadach komercyjnych przed praktycznym wdrożeniem do selekcji genetycznej. Taką analizę wykonano w badaniach własnych dla komercyjnych mieszańców świń należących do zasobów genetycznych holenderskiej firmy hodowlanej IPG Institute for Pig Genetics BV (obecnie TOPIGS/NORSVIN Beuningen) (**publikacja 8**). Genotypowanie przy pomocy markerów mikrosatelitarnych zostało przeprowadzone dla ramienia q chromosomu SSC4, natomiast analizowane cechy fenotypowe objęły cechy jakości tuszy (m.in. otłuszczenie oraz masa szynki i polędwicy) oraz mięsa (m.in. barwa, pH oraz marmurkowatość). W efekcie potwierdzona zostały trzy regiony QTL, które mogą stać się podstawą do selekcji wspomaganej markerami (ang. MAS – *marker-assisted selection*).

4.3. Stymulacja miogenezy u kurcząt poprzez modulację termiczną i naświetlanie

Masa mięśnia piersiowego u kurcząt zależy głównie od liczby i wielkości włókien mięśniowych zbudowanych z podłużnych komórek mięśniowych (mioblastów). Liczba włókien mięśniowych jest kształtowana podczas rozwoju embrionalnego, po czym większość komórek mięśniowych (za wyjątkiem komórek satelitowych) traci zdolność do proliferacji (hiperplazji), a rozrost mięśnia następuje tylko w wyniku hipertrofii. Procesy tworzenia

komórek mięśniowych podczas rozwoju embrionalnego pozostają pod kontrolą grupy czynników transkrypcyjnych kodowanych przez geny miogeniczne (*miogenina*, *MyoD1* oraz *Myf5*). W celu zwiększenia tempa miogenezy poprzez manipulację genami miogenicznymi, podczas rozwoju embrionalnego zastosowano dodatkowe stymulanty abiotyczne. Czynnikiem eksperymentalnym były: temperatura (cykliczne kondycjonowanie termiczne jaj w dniach 15-18 inkubacji) oraz naświetlanie jaj światłem zielonym (sygnał odbierany przez siatkówkę embrionalnego oka, podawany między 1 a 18 dniem inkubacji) (**publikacja 19**). U zarodków poddanych stymulacji procesów miogenezy *in ovo* przy pomocy warunków termicznych, wykryto wzrost ekspresji genu miogeniny oraz spadek ekspresji *Myf5*, mierzonych podczas późnych faz rozwoju embrionalnego. Z kolei, zastosowanie naświetlania światłem zielonym spowodowało wzrost ekspresji genu miogeniny zarówno podczas życia embrionalnego, jak i wczesnych etapów po wylęgu; spadek ekspresji genu *Myf5* w późnych etapach embrionalnych oraz *MyoD1* podczas pierwszych dni po wylęgu. Modułacja genów miogenicznych poprzez manipulację warunkami rozwojowymi zarodka kury daje potencjał do poprawy parametrów produkcyjnych kurcząt poprzez modulację *in ovo*. Zwiększona ekspresja genu miogeniny, odpowiedzialnego za różnicowanie progenitorów mięśni (mioblastów) w komórki mięśniowe, stanowi potencjalne źródło poprawy parametrów wzrostu mięśnia piersiowego u kurcząt broilerów. W efekcie, zastosowana stymulacja *in ovo* może prowadzić do poprawy efektywności produkcji drobiarskiej, stanowiąc kolejne narzędzie biotechnologiczne do otrzymywania produktów żywnościowych określonej jakości.

4.4. Długofalowe efekty podania prebiotyku i synbiotyku *in ovo*

W badaniach własnych istotną tematyką jest sterowanie organizmem gospodarza (kura) poprzez stymulację jego mikrobiomu prebiotykiem lub synbiotykiem podanym *in ovo*. Metoda ta, opisana szczegółowo w publikacji przeglądowej (**publikacja 9**) daje różnorodne i silne efekty fenotypowe, utrzymujące się przez cały okres życia osobniczego kurcząt broilerów. W przypadku cech produkcyjnych, podanie prebiotyku ORR oraz trzech synbiotyków zawierających ORR i różne szczepy *L. lactis* nieznacznie wpłynęło na wzrost masy ciała w porównaniu do kontroli (**publikacja 16**). Natomiast, podanie dwóch synbiotyków istotnie podwyższyło wskaźnik wykorzystania paszy (ang. FCR – *feed conversion ratio*). We wszystkich analizowanych przypadkach, podanie prebiotyku i synbiotyku *in ovo* doprowadziło do zmiany mikrostruktury mięśnia piersiowego kurcząt broilerów: zwiększyła się średnica włókien mięśniowych przy spadku zagęszczenia włókien oraz zawartości śródmięśniowego kolagenu.

Wdrażanie technologii *in ovo* do podawania substancji bioaktywnych podczas rozwoju embrionalnego kurcząt wymaga procedury optymalizacji dawek oraz weryfikacji mierzalnych efektów w porównaniu do innych metod podania (w paszy lub w wodzie). W tym celu, w badaniach własnych opracowano protokół podania prebiotyku metodą *in ovo* bez utraty wylęgowości, natomiast przy zachowaniu korzystnych efektów fenotypowych (**publikacja 22**). Metoda ta zakłada podanie *in ovo* wzrastających koncentracji prebiotyku poprzez iniekcję w 12 dobie inkubacji i ocenę dwóch parametrów: (1) wylęgowości oraz (2) profilu bakteryjnego nowo wylęzonych piskląt. Na tej podstawie, dawki substancji bioaktywnych do iniekcji *in ovo*, są bezpieczne dla rozwoju embrionalnego kurcząt, jak również efektywnie wspierają rozwój mikroflory jelitowej już w jaju.

4.4. Modele *in vitro* do oceny efektów wpływu środowiska na procesy biologiczne

Obecne trendy w badaniach biologicznych zmierzają ku szerszemu wykorzystaniu technik *in vitro*, zwłaszcza w badaniach przesiewowych. Prawidłowo skonstruowane modele komórkowe i tkankowe pozwalają na prowadzenie informatywnych eksperymentów przy użyciu ograniczonej liczby zwierząt. Warunkiem wykorzystywania modeli *in vitro* jest jednak odpowiedni warsztat badawczy, zwłaszcza w kontekście czystości mikrobiologicznej (**publikacja 21**). Poza linią komórkową DT40, która została wykorzystana do doboru prebiotyku i probiotyku w synergistyczny synbiotyki, w badaniach własnych wykorzystano również linię HD11, składającą się z populacji monocytów i makrofagów kurczących. Linia ta została wykorzystana do modelowania *in vitro* reakcji komórek układu immunologicznego na stres cieplny oraz endotoksemię (jako endotoksynę zastosowano lipopolisacharyd) (**publikacja 24**). Podczas stresu cieplnego aktywowana została ekspresja genów kodujących molekularne chaperony (*HSP25*, *HSPA2* i *HSPH1*) i kochaperony (*DNAJA4* i *DNAJB6*), jak również gen *BAG3* o charakterze antyapoptotycznym. Z kolei, w przypadku działania dwóch stymulantów (wysoka temperatura oraz endotoksyna), HD11 wygenerowały silniejszą odpowiedź immunologiczną, wyrażoną ekspresją takich genów jak *CCL4*, *CCL5*, *IL1B*, *IL8* oraz *iNOS*, niż w przypadku działania samej endotoksyny. Wskazuje to na immunostymulujące działanie stresu cieplnego oraz przystosowanie makrofagów do eliminacji szkodliwych skutków działania endotoksenu wywołanej w reakcji na wysoką temperaturę.

Doskonałym modelem komórek limfatycznych *in vitro* jest hodowla pierwotna komórek dendrytycznych różnicowanych z komórek szpiku kostnego kurcząt (ang. BMDC – *bone marrow-derived dendritic cells*) (**publikacja 23**). Komórki BMDC zostały wykorzystane do analizy porównawczej wpływu czynnika genetycznego (Leghorn vs. Fayoumi) na funkcjonalną

odpowiedź na biotyczny (lipopolisacharyd) i abiotyczny (wysoka temperatura) czynnik środowiskowy. W efekcie wykazano, że BMDC pochodzące od rasy odpornej na choroby i wysokie temperatury (Fayoumi) reagują silniejszą ekspozycją głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II), podwyższoną produkcją tlenu azotu oraz silniejszą fagocytozą w porównaniu do BMDC pochodzących od rasy bardziej podatnej na choroby (Leghorn).

5. Literatura

1. Sławińska A., D'Andrea M., Pilla F., Bednarczyk M., Siwek M. (2013) Expression profiles of Toll-like receptors 1, 2 and 5 in selected organs of commercial and indigenous chickens. *J Appl Genet* 54:483-7.
2. Sławińska A., Siwek M., Żylińska J., Bardowski J., Brzezińska J., Gulewicz K.A., Nowak M., Urbanowski M., Płowiec A., Bednarczyk M. (2014) Influence of synbiotics delivered *in ovo* on immune organs development development and structure. *Folia Biol-Krakow* 62:277-285.
3. Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M. (2014) Effects of synbiotics injected *in ovo* on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am J Vet Res* 75:997-1003.
4. Płowiec A., Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M. (2015) Effect of *in ovo* administration of inulin and *Lactococcus lactis* on immune-related gene expression in broiler chickens. *Am J Vet Res* 76:975-982.
5. Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M. (2016) *In vitro* screening of immunomodulatory properties of the synbiotics in chicken DT40 cell line. *Anim Sci Pap Rep* 34: 81-93.
6. Maciuszonek A. (obecnie Sławińska A.), Grajewski B., Bednarczyk M. (2005) RAPD-PCR analysis of various goose populations. *Folia Biol-Krakow*, vol. 53:83-85.
7. Lisowski M., Sławińska A., Dłuzniewska P., Mazanowski A., Bednarczyk M. (2008) Analysis of DNA polymorphism (RAPD-PCR) and reciprocal effects of geese crossbreeds. *Folia Biol-Krakow*, 56:159-164.
8. Sławińska A., Siwek M., Knol E.F., Roelofs-Prins D.T., van Wijk H.J., Dibbitts B., Bednarczyk M. (2009) Validation of the QTL on SSC4 for meat and carcass quality traits in a commercial crossbred pig population. *J Anim Breed Genet* 126:43-51.
9. Bednarczyk M., Brzezińska J., Sławińska A., Siwek M., Urbanowski M., Kasperczyk K. (2010) *Technologia in ovo* – narzędziem w nowoczesnej profilaktyce drobiu. *BioTechnologia*, 88:102-111.
10. Sławińska A., Siwek M. (2010) Kura (*gallus gallus*) najnowsze osiągnięcia z zakresu genomiki. *BioTechnologia*, 90:36-46.
11. Siwek M., Sławińska A., Nieuwland M., Witkowski A., Zięba G., Minozzi G., Knol E.F., Bednarczyk M. (2010) A quantitative trait locus for a primary antibody response to keyhole limpet hemocyanin on chicken chromosome 14—Confirmation and candidate gene approach. *Poult Sci* 89: 1850-1857.
12. Siwek M., Sławińska A., Łakota P., Grajewski B., Wawrzyńska M., Wiśniewska E., Pławski A., Słomski R., Bednarczyk M. (2010) Identification of the Rate of Chimerism of Different Tissues with Microsatellite Markers in Chicken Chimeras. *Folia Biol-Krakow* 58: 257-263.
13. Sławińska A., Witkowski A., Bednarczyk M., Siwek M. (2011) *In silico* analysis of candidate genes associated with humoral innate immune response in chicken. *BMC Proc, Suppl* 4: S36.
14. Sławińska A., Witkowski A., Bednarczyk M., Nieuwland M., Minozzi G., Siwek M. (2011). Quantitative trait loci associated with the humoral innate immune response in chickens were confirmed in a cross between Green-Legged Partridge-like and White Leghorn. *Poult Sci* 90: 1909-15.
15. Siwek M., Szyda J., Sławińska A., Bednarczyk M. (2012) Detection of two QTL on chicken chromosome 14 for keyhole limpet hemocyanin. *J Appl Genet* 53: 115-119.
16. Maiorano, G., Sobolewska, A., Cianciullo, D., Walasik, K., Elminowska-Wenda, G., Sławińska, A., Tavaniello, S., Żylińska, J., Bardowski, J., Bednarczyk, M. (2012) Influence of *in ovo* prebiotic and synbiotics administration on meat quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 91:2963-2969.
17. Sławińska A., Siwek M. (2013) Meta - and combined - QTL analysis of different experiments on immune traits in chickens. *J Appl Genet* 54:483-487.
18. Sławińska A., Brzezińska J., Siwek M., Elminowska – Wenda G. (2013) Expression of myogenic genes in chickens stimulated *in ovo* with light and temperature. *Rep Biol* 13:161-165.

19. Siwek M., Wragg D., Sławińska A., Malek M., Hanotte O., Mwacharo J.M. (2013) Insights into the genetic history of Green-legged Partridge fowl: mtDNA and genome wide SNP analysis. *Anim Genet* 44:522-32.
20. Siwek M., Sławińska A., Rydzanicz M., Wesoly J., Fraszczak M., Suchocki T., Skiba J., Skiba K., Szyda J. (2015) Identification of candidate genes and mutations in QTL regions for immune responses in chicken. *Anim. Genet* 46:247-54.
21. Dunisławska A., Płowiec A., Sławińska A., Siwek M. (2016) Kontaminacje w zwierzęcych kulturach komórkowych. *Med. Wet.* 72:211-216.
22. Bednarczyk M., Stadnicka K., Kozłowska I., Abiuso C., Tavaniello S., Dankowiakowska A., Sławińska A., Maiorano G. (2016) Influence of different prebiotics and mode of their administration on broiler chicken performance. *Animal* 10:1271-1279.
23. Van Goor A., Sławińska A., Schmidt C.J., Lamont S.J. (2016) Distinct functional responses to stressors of bone marrow derived dendritic cells from diverse inbred chicken lines. *Dev Comp Immunol* 63:96-110.
24. Sławińska A., Hsieh J.C., Schmidt C.J., Lamont S.J. (2016) Heat Stress and Lipopolysaccharide Stimulation of Chicken Macrophage-Like Cell Line Activates Expression of Distinct Sets of Genes. *PLoS One*. 2016 Oct 13;11(10):e0164575.

Anna Sławińska

13.12.2016.