



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

**RADA NAUKOWA DYSZYPLINY
ZOOTECHNIKA I RYBACTWO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów
naukowych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo

mgr inż. Elżbieta Pietrzak

**WPLYW GALAKTOOLIGOSACHARYDÓW
NA MODULACJĘ EKSPRESJI GENÓW ZWIĄZANYCH
Z UKŁADEM IMMUNOLOGICZNYM PTAKÓW I RYB**

*Impact of galactooligosaccharides on immune-related
gene expression signatures in birds and fish*

**DZIEDZINA: nauki rolnicze
DYSZYPLINA: zootechnika i rybactwo**

PROMOTOR

DR HAB. INŻ. ANNA SŁAWIŃSKA, PROF. UCZELNI
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I GENETYKI ZWIERZĄT
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT
UNIwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. J. Śniadeckich w Bydgoszczy

**BYDGOSZCZ
2020**

Źródła finansowania

OVOBOTIC – „*In ovo* delivery of prebiotic in commercial and indigenous Italian chicken breeds provides a contribution to healthy food production under a heat stress” – projekt finansowany przez MIUR (Ministero dell’Istruzione dell’Università e della Ricerca) z siedzibą w Rzymie (Włochy) **(P-1)**; BN 51/2019 – „Badania z zakresu biotechnologii i genetyki zwierząt” – źródło finansowania pochodzące z subwencji na badania naukowe MNiSW (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego) z siedzibą w Warszawie (Polska) **(P-2)**.

Podziękowania

*Serdeczne podziękowania kieruję do Pani Promotor
dr hab. inż. Anny Sławińskiej, profesor uczelni,
dzięki której miałam możliwość zrealizowania
niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję za zaufanie, jakim mnie Pani obdarzyła,
wsparcie i wszystkie wskazówki,
których wartość jest dla mnie nieoceniona.*

*Pragnę podziękować również wszystkim pracownikom
Katedry Biotechnologii i Genetyki Zwierząt,
a w szczególności Pani Prof. dr hab. inż. Marii Siwek
oraz dr inż. Aleksandrze Dunisławskiej
za życzliwość i okazaną mi pomoc.*

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	7
2. Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej	10
3. Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy doktorskiej	11
3.1. Hipoteza badawcza i cel badawczy	12
3.2. Materiały i metody badań	13
3.2.1. Układ eksperymentalny	13
3.2.2. Izolacja RNA	14
3.2.3. RT-qPCR	14
3.2.4. Geny referencyjne	14
3.2.5. Geny badane	15
3.2.6. Względna analiza ekspresji genów	16
3.2.7. Analiza statystyczna	16
3.3. Wyniki	17
3.3.1. Efekt stymulacji <i>in ovo</i> oraz temperatury otoczenia na badane geny.....	17
3.3.2. Efekt stymulacji <i>in ovo</i> oraz formy stresu cieplnego na badane geny	17
3.3.3. Profil względnej ekspresji genów w odpowiedzi na stres cieplny	17
3.3.4. Względna ekspresja genów po stymulacji <i>in ovo</i> w warunkach stresu cieplnego	18
3.3.5. Geny referencyjne dla błony śluzowej karpia	18
3.3.6. Wpływ suplementacji GOS na sygnatury ekspresji genów w SALT.....	18
3.4. Dyskusja	19
3.4.1. Efekty podania GOS <i>in ovo</i> u kurcząt w odpowiedzi na stres cieplny	19
3.4.1.1. Regulacja sygnatur ekspresji cytokin	19
3.4.1.2. Regulacja szlaku antyoksydacyjnego	20
3.4.1.3. Walidacja genów referencyjnych karpia	20
3.4.1.4. Ekspresja genów w błonie śluzowej skóry karpia po podaniu GOS	21
3.5. Podsumowanie wyników i wnioski	22
3.6. Literatura	23

4. Streszczenie	27
5. Abstract	29
6. Załączniki (obowiązkowe)	31
6.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej ..	32
6.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej	67
6.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych	68

1. WSTĘP

Ptaki (*Aves*) i ryby kostnoszkieletowe (*Osteichthyes*) należą do strunowców, podtypu kręgowców (*Vertebrata*). Kręgowce zamieszkują różne środowiska; z tego względu stanowią podtyp o silnym zróżnicowaniu morfologicznym i fizjologicznym. Szacuje się, że pierwsze kręgowce pojawiły się na Ziemi w okresie „kambryjskiej eksplozji życia”, około 525 mln lat temu. W podtypie kręgowców jako pierwsze wyewoluowały ryby kostnoszkieletowe (około 400 mln lat temu), natomiast pierwsze ptaki pojawiły w następstwie procesu ewolucyjnego ryb około 250 mln lat później (Korzeniewski 1996). Ta odległość ewolucyjna powoduje, że między przedstawicielami obu gromad występują znaczące różnice na poziomie środowiskowym (środowisko życia), morfologicznym (odmienna budowa ciała), fizjologicznym (różnica w sposobie termoregulacji) oraz molekularnym (sekwencja genomu). Różnice na poziomie molekularnym dotyczą przede wszystkim rozmiaru genomowego DNA. Genom karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*) ma długość 1423,63 Mpz (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=carp>). DNA genomowe karpia jest podzielone na 50 chromosomów. Liczba ta najprawdopodobniej wynika z duplikowania genomu czyli allotetraploidyzacji, która nastąpiła około 8 mln lat temu (Wang i in. 2012). Genom kury (*Gallus gallus domesticus*) obejmuje 1043,19 Mpz (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=gallus+gallus>). Kariotyp kury składa się z 38 chromosomów autosomalnych (GGA1-GGA38) i dwóch chromosomów płci (GGAW i GGAZ). Wielkość chromosomów kury jest zróżnicowana i waha się w granicach od 5Mpz do 200 Mpz. Z tego względu, chromosomy autosomalne (GGA1-GGA8) oraz chromosomy płci (GGAW i GGAZ) zaliczane są do makrochromosomów, natomiast pozostałe chromosomy autosomalne (GGA9-GGA38) należą do mikrochromosomów (Sławińska i Siwek 2010). Pomimo tak znaczących różnic na poziomie genetycznym, współdzielenie linii ewolucyjnej powoduje, że wiele ścieżek rozwojowych dla ryb i ptaków, takich jak układy narządów oraz niektóre mechanizmy fizjologiczne, wykazują pewne podobieństwo.

Układ immunologiczny to układ narządów i naczyń limfatycznych, komórek limfatycznych oraz wytwarzanych przez nie molekuł immunomodulujących. Układ immunologiczny bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, która stanowi reakcję na czynniki prowadzące do zaburzenia homeostazy. U wszystkich organizmów żywych występuje układ immunologiczny. Może on mieć charakter prymitywny lub bardziej złożony. Wszystkie żuchwowce (w tym ryby kostnoszkieletowe oraz ptaki) posiadają strukturę układu immunologicznego cechującą się wysoką konserwatywnością odporności nieswoistej (wrodzonej) oraz dwustronną komunikacją między elementami odporności nieswoistej (wrodzonej) i swoistej (adaptacyjnej) (Rauta, Nayak i Das 2012). Układ immunologiczny jest wyposażony w warstwowe mechanizmy obronne, których specyficzność wzrasta, jeżeli występuje taka potrzeba. Bariery fizyczne zapobiegają przedostawaniu się patogenów do organizmu. Jeżeli dojdzie do przekroczenia tej bariery, natychmiastowej aktywacji ulega nieswoista odpowiedź immunologiczna. Dopiero, gdy ta okaże się niewystarczająca, uruchamiane są mechanizmy swoistego układu immunologicznego (m.in. odpowiedź komórkowa i humoralna ze strony limfocytów) (Gołab i in. 2017).

U ryb kostnoszkieletowych najsilniejsze działanie przypisuje się odporności nieswoistej, gdyż mechanizmy odporności swoistej są bardziej złożone i biologicznie kosztowne. Specyfika środowiska wodnego naraża ryby na stałe działanie stresorów mikrobiologicznych, fizycznych oraz mechanicznych. Dlatego u ryb skóra stanowi pierwszą linię obrony i jest uznawana za jeden z najważniejszych narządów immunologicznych (Wang i in. 2011). Poza mechaniczną barierą, skóra ryb wyposażona jest w wysoko aktywną metabolicznie błonę śluzową (Fast i in. 2002). W warstwie śluzu pokrywającego ciało ryby znajdują się liczne komponenty przeciwbakteryjne, w tym białka i enzymy, takie jak: lizozym i enzymy

proteolityczne, immunoglobuliny, białka dopełniacza, lektyny i białka C-reaktywne (Swain i in. 2007). Naskórek i skóra właściwa ryb zawierają szereg komórek immunokompetentnych, w tym komórki nabłonkowe, śluzowe, maczugowate i kubkowe, które odpowiadają tkance limfatycznej związanej ze skórą (SALT – skin-associated lymphoid tissue). Główną funkcją SALT jest lokalne rozpoznawanie antygenów i neutralizowanie ich za pomocą mechanizmów nieswoistych, jak i swoistych (Streilein 1983), co przypomina działanie mechanizmów odpornościowych błony śluzowej jelit (Xu i in. 2013).

Ptaki są pierwszymi kręgowcami, u których można wyróżnić wyraźną dychotomię układu limfatycznego. Nie posiadają one w swoim układzie immunologicznym takiej struktury, jak węzły chłonne. Natomiast, można u nich wyodrębnić dwa centralne narządy limfoidalne, czyli bursę Fabrycjusza, w której dojrzewają i nabierają właściwości immunokompetentnych limfocyty B oraz grasice, w której analogicznie dojrzewają limfocyty T (Zhang i in. 2019). Grasicca składa się z siedmiu płatów zlokalizowanych po każdej stronie żył szyjnych. Grasicca otrzymuje informacje z innych tkanek limfatycznych (pierwotnych i wtórnych) przez naczynia krwionośne. Bursa Fabrycjusza jest uchyłkiem kloaki. U kurcząt stanowi owalną strukturę znajdującą się między kloaką a kością krzyżową. Kanał kaletki umożliwia ciągłą komunikację między kloaką a bursą (Oláh, Nagy, i Vervelde 2013). Kolejnym elementem układu limfatycznego ptaków jest tkanka limfatyczna związana z jelitami (GALT – gut-associated lymphoid tissue), która stanowi integralną część rozległej tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi. GALT składa się z komórek limfoidalnych rozproszonych w tkance nabłonkowej i zorganizowanych struktur limfatycznych w obrębie blaszki właściwej, kępek Peyera, migdałków jelit ślepych oraz – w mniejszym stopniu – w uchyłku Meckela (Lorenzoni 2012). Śledziona jest największym wtórnym narządem limfatycznym u ptaków. Posiada kulisto-wydłużony kształt i jest usytuowana po prawej stronie przedżołądka. Śledziona odpowiada za produkcję immunoglobulin oraz oczyszczanie krwi z wadliwych lub starych elementów morfotycznych (Oláh i in. 2013). Podczas rozwoju embrionalnego, śledziona działa jako narząd krwiotwórczy. Po migracji limfocytów i wytworzeniu czerwonej i białej miazgi, śledziona odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, szczególnie związanej z reakcją na antygeny krwiopochodne (Zhang i in. 2019).

Kluczowym elementem w przebiegu odpowiedzi immunologicznej jest mikrobiota zasiedlająca błonę śluzową i światło jelita. W świecie zdominowanym przez mikroorganizmy, prawidłowa interakcja eukariotycznego gospodarza z mikrobiotą zasiedlającą jego błony śluzowe jest ważna dla osiągnięcia i utrzymania homeostazy. Mikrobiota jelitowa tworzy barierę ochronną poprzez adhezję do ścian nabłonka jelit (enterocytów), zmniejszając tym samym możliwość kolonizacji błony śluzowej przez bakterie chorobotwórcze. Mikroorganizmy wchodzące w skład mikrobioty jelitowej wytwarzają związki przeciwdrobnoustrojowe oraz utrzymują równowagę między procesami tolerancji względem bakterii komensalnych i lokalnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko patogenom jelitowym (Yegani i Korver 2008). Zachowanie prawidłowego składu mikrobioty jelitowej jest niezbędne do produkcji mucyny i utrzymania odpowiedniej warstwy śluzowej w układzie pokarmowym, które zabezpieczają komórki nabłonkowe gospodarza przed kontaktem z mikroorganizmami (Drozdowski i Thomson 2006). Na skład mikrobioty jelitowej ma wpływ wiele czynników, zarówno korzystnych (m.in. suplementacja prebiotykami, probiotykami, synbiotykami lub eubiotykami), jak i niekorzystnych (m.in. podanie antybiotyków lub stres cieplny) (Suzuki i in. 1983). Stan nie zrównowazenia mikrobioty nazywany jest dysbiozą i może prowadzić upośledzenia funkcji bariery jelitowej. Podczas dysbiozy treść jelitowa przedostaje się do krwioobiegu, powodując przewlekłe ogólnoustrojowe zapalenie (Tellez Jr., Tellez-Isaias i Dridi 2017), w wyniku przenikania do ustroju endotoksyn bakteryjnych (Heled, Fleischmann i Epstein 2013).

Prebiotyki to niestrawne węglowodany, które korzystnie wpływają na zdrowie gospodarza, poprzez selektywne stymulowanie wzrostu i aktywności mikrobioty (Roberfroid i in. 2010). Dodatek substancji prebiotycznych w regularnej mieszance paszowej lub jako wczesna stymulacja mikrobiomu poprzez iniekcję *in ovo*, pozwala na rozwój i zachowanie korzystnej mikrobioty jelitowej zwierząt (Baurhoo, Phillip, i Ruiz-Feria 2007; Sohail i in. 2010; Wang i in. 2018). Galaktooligosacharydy (GOS) są syntetyzowane z laktozy na drodze reakcji enzymatycznej. Reakcja ta jest katalizowana przez glikozydazy (EC 3.2.1.X), z których najpowszechniej stosowane są β -galaktozydazy (EC 3.2.1.23). GOS powstaje poprzez przeniesienie glikozyłu jednej lub więcej jednostek D-galaktozyłu na ugrupowanie D-galaktozy laktozy. Posiada on od 2 do 8 jednostek sacharydowych, przy czym jedna z tych jednostek jest końcową glukozą, a pozostałe jednostki sacharydowe to galaktoza i disacharydy, zawierające dwie jednostki galaktozy (Tzortzis i in. 2005). GOS ma pozytywny wpływ na mikrobiotę jelitową różnych gatunków zwierząt w tym drobiu i ryb (Hughes i in. 2017; Sławinska i in. 2019; Hoseinifar, Doan i Ashouri 2019). Stanowi on selektywną pożywkę dla korzystnych bakterii oraz może on wywierać bezpośredni efekt przeciwdrobnoustrojowy poprzez przyleganie do miejsc wiązania bakterii na powierzchni enterocytów, a tym samym blokować adhezję bakterii chorobotwórczych do nabłonka jelit (Gibson i in. 2005).

Wykorzystanie GOS w akwakulturze wpływa pozytywnie na funkcje SALT ryb. Wykazano wzrost aktywności czynników immunologicznych na poziomie białka u karpia zwyczajnego (Hoseinifar i in. 2017). W powyższym doświadczeniu porównano działanie trzech prebiotyków (FOS, GOS i inuliny) i wykazano znacząco wyższy poziom aktywności lizozymu skórnoego oraz w surowicy krwi. Podobne efekty uzyskano u innych gatunków ryb, w tym u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) (Hoseinifar i in. 2015) oraz białych rybek kaspjskich (*Rutilus frisii kutum*) (Hoseinifar i in. 2016). Poprawę właściwości immunologicznych błon śluzowych w efekcie suplementacji GOS wykazano również u karasia złocistego (*Carassius auratus auratus*) (Miandare i in. 2016). Dodatkowo, GOS poprawił funkcjonowanie jelit i budowę mięśni u karpia zwyczajnego (Ziółkowska i in. 2020). Obraz histologiczny ujawnił poprawę wysokości i grubości kosmków jelitowych, co sugeruje lepszą dojrzałość błony śluzowej jelita po suplementacji GOS.

GOS wpłynął pozytywnie na mikrobiotę jelitową drobiu (Hughes i in. 2017). Szczególnie interesujący jest sposób podania GOS przy zastosowaniu technologii *in ovo* w celu wczesnej stymulacji mikrobioty jelitowej kurcząt (Sławinska i in. 2016; Sławinska i in. 2019; Sławinska i in. 2020). Dane molekularne dotyczące doświadczeń na brojlerach kurczących wykazały, że GOS podany *in ovo* równoważy ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną i stresową wywołaną przez indukowany stres cieplny u dorosłych osobników (Sławinska i in. 2019). Ponadto, GOS poprawia cechy związane z wydajnością, takie jak tempo wzrostu, wykorzystanie paszy (Sławinska i in. 2020) oraz jakość mięsa (Tavaniello i in. 2020) u brojlerów kurczących poddanych długotrwałemu stresowi cieplnemu.

2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **(P-1) Pietrzak E.**; Dunislawska A.; Siwek M.; Zampiga M.; Sirri F.; Meluzzi A.; Tavaniello S.; Maiorano G.; Slawinska A. Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated *in ovo* with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. *Animals* 2020, 10, 474, DOI: 10.3390/ani10030474, Punktacja MNiSW₂₀₁₉ = 100 pkt., *Impact Factor*₂₀₁₉ = 2,323
2. **(P-2) Pietrzak E.**; Mazurkiewicz J.; Slawinska A. Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (*Cyprinus carpio*) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides. *Animals* 2020, 10, 438, DOI: 10.3390/ani10030438, Punktacja MNiSW₂₀₁₉ = 100 pkt., *Impact Factor*₂₀₁₉ = 2,323

Podsumowanie wskaźników cyklu publikacji:

Sumaryczna liczba punktów MNiSW = 200 pkt.

Sumaryczny *Impact Factor* = 4,646

3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Problematyka badawcza niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy immunomodulującego wpływu prebiotyku GOS (galaktooligosacharydy) na dwa różne gatunki zwierząt gospodarskich z gromady ptaków i ryb. Wprowadzenie GOS do praktyki hodowlanej może mieć pozytywny wpływ na system immunologiczny zwierząt, których środowisko bogate jest w różnorodne stresory. Wyzwania występujące w produkcji drobiarskiej oraz w akwakulturach ryb słodkowodnych pociągają za sobą potrzebę poszukiwania metod poprawy statusu immunologicznego w sposób przyjazny dla zwierząt, konsumentów i środowiska. Prebiotyk GOS stanowi pożywkę dla rozwoju mikrobioty jelitowej, nawet w wymagających warunkach, takich jak stres cieplny lub gęsta obsada zwierząt. Pomimo znacznych różnic biologicznych występujących w środowisku życia, morfologii, czy termoregulacji, kury i karpie wykazują pewien wspólny potencjał, który przejawia się poprzez możliwość modulacji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w wyniku dostarczenia GOS. Badania nad wpływem GOS na zmianę poziomu mRNA genów związanych z odpowiedzią immunologiczną u odległych ewolucyjnie gatunków zwierząt, jak kury i karpie, dostarczają szerokie spektrum danych o interakcji między podanym prebiotykiem a modulacją nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. W tym kontekście, spójność tematyczna cyklu publikacji wiąże się z zastosowaną substancją bioaktywną (GOS), jak również metodą badawczą (RT-qPCR), odnoszącą się do modulacji odpowiedzi immunologicznej w badanych organizmach.

3.1. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL BADAWCZY

Główna hipoteza sformułowana w tej pracy brzmi następująco: „**Prebiotyk GOS podany *in ovo* lub w paszy wpływa na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym u ptaka (kura) i ryby (karp)**”.

Hipotezy szczegółowe:

- (P-1)** GOS podany *in ovo* w 12. dobie inkubacji jaj wpływa na odpowiedź immunologiczną oraz odpowiedź na stres cieplny u kur wolno rosnących (*Gallus gallus domesticus*);
- (P-2)** GOS podany w formie dodatku paszowego wpływa na modulację względnej ekspresji genów związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w śluzie skórnym karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*).

Celem ogólnym niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena wpływu prebiotyku GOS podanego *in ovo* lub w paszy na względną ekspresję genów związanych z układem immunologicznym u ptaków na przykładzie kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) i ryb na przykładzie karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*).

Cele szczegółowe:

- (P-1)** Celem eksperymentu była analiza molekularnych podstaw nieswoistej odpowiedzi immunologicznej na stres cieplny u kur wolno rosnących stymulowanych *in ovo* prebiotykiem GOS;
- (P-2)** Celem eksperymentu była analiza molekularnych podstaw nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w błonie śluzowej skóry karpia suplementowanych prebiotykiem GOS.

3.2. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

3.2.1. Układ eksperymentalny

Galaktooligosacharydy (GOS) wykorzystane w obu eksperymentach to produkt Bi₂tos[®] pochodzące od producenta Clasado Biosciences Ltd. (Jersey, UK). Otrzymywany jest on na drodze enzymatycznej przez transgalaktozylację laktozy pochodzącej z mleka przez komórki *Bifidobacterium bifidum* 41171 (Tzortzis, Goulas, i Gibson 2005). Otrzymany w ten sposób prebiotyk GOS ma postać suchego proszku zawierającego następujący skład oligosacharydów: 45% laktozy, 9,9% disacharydów, [Gal (β 1-3)- Glc; Gal (β 1-3)- Gal; Gal (β 1-6)- Gal; Gal (α 1-6)- Gal], 23,1% trisacharydów [Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)- Glc; Gal (β 1-3)- Gal (β 1-4)- Glc], 11,55% tetrasacharydów [Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)- Glc] oraz 10,45% pentasacharydów [Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-6)- Gal (β 1-4)- Glc].

W doświadczeniu stanowiącym podstawę publikacji **(P-1)**, materiał badawczy pobrano od kur (*Gallus gallus domesticus*) w typie wolno rosnącym. Genotyp kurcząt wykorzystanych do badań powstał w wyniku kojarzenia samca Hubbard RedBro z samicą Hubbard JA57. W 12. dobie inkubacji jaj (600 jaj, po 300 jaj na grupę) przeprowadzono iniekcję *in ovo*, poprzez wprowadzenie do komory powietrznej jaja roztworu GOS dla grupy eksperymentalnej (3,5 mg GOS/jajo) lub roztworu soli fizjologicznej dla grupy kontrolnej (C) (procedura opisana w publikacji **P-1**). Po wylęgu, kurczęta przeniesiono do kurnika z kontrolowanymi warunkami utrzymania (szczegóły odchowu zawiera publikacja **P-1**), gdzie podzielono je na kolejne dwie podgrupy ze względu na temperaturę otoczenia (termoneutralna lub stres cieplny). Stres cieplny, polegający na podniesieniu temperatury otoczenia zwierząt do 30°C, wprowadzono w 36 dobie odchowu kurcząt. Dla każdej grupy wykonano sześć powtórzeń (kojec jako powtórzenie, 25 osobników/kojec, 150 osobników/grupę). Eksperyment opisany w publikacji **(P-1)** przeprowadzono w układzie czynników 2x2x2 (C/GOS x warunki termoneutralne/stres cieplny x stres cieplny ostry/stres cieplny chroniczny). Uboju i dysekcji dokonano w dwóch punktach czasowych, związanych z długością trwania stresu cieplnego (stres cieplny ostry i chroniczny). Stres cieplny ostry zdefiniowano jako reakcję kurcząt na pierwsze osiem godzin stresu cieplnego (36. doba odchowu), a stres chroniczny jako reakcję kurcząt na 14 dni stałego stresu cieplnego (50. doba odchowu). Materiałem biologicznym służącym do pozyskania RNA od kurcząt był fragment śledziony (n=8). Część doświadczeń opisanych w publikacji **(P-1)** związana z odchowem, ubojem i dysekcją odbyła się w Zakładzie Doświadczalnym Uniwersytetu w Bolonii (Włochy) i została przeprowadzona na podstawie zgody o numerze 503/2016 wydanym przez Komisję Etyczną w Rzymie (Włochy).

Doświadczenie opisane w publikacji **(P-2)** przeprowadzono na 300 jednorocznych rybach z gatunku karp pospolity (*Cyprinus carpio*). Ryby odchowano w Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie (woj. wielkopolskie) należącym do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Karpie o średniej masie ciała 180g umieszczono w 12 zbiornikach (po 25 szt. w każdym). Eksperyment przeprowadzono w układzie dwóch grup: eksperymentalnej, suplementowanej dodatkiem GOS, stanowiącym 2% regularnej mieszanki paszowej (dokładny skład mieszanki podano w publikacji **P-2**) oraz kontrolnej (C), żywionej paszą pozbawioną prebiotyku. Część żywieniowa eksperymentu trwała 50 dni. Tkanki do badań stanowił śluz skórny pobrany przyżyciowo (n=8). Śluz pobrano z okolicy linii bocznej przy pomocy szkiełka podstawowego. Doświadczenie opisane w publikacji **(P-2)** zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu i nie wymagało odrębnej zgody Komisji Etycznej.

3.2.2. Izolacja RNA

Materiałem badawczym w obu eksperymentach (**P-1** i **P-2**) były fragmenty tkanek pobrane do probówek zawierających substancję stabilizującą fixRNA (EURx, Gdańsk, Polska). Całkowity RNA pozyskano z fragmentu śledziony (**P-1**) oraz śluzu skórniego (**P-2**) poprzez homogenizację tkanki w TRI Reagent® (MRC, Cincinnati, OH, USA) oraz ekstrakcję z dodatkiem chloroformu. Oczyszczanie RNA wykonano metodą kolumnkową, z wykorzystaniem Universal RNA Purification Kit, zgodnie z zaleceniami producenta (EURx, Gdańsk, Polska). Koncentrację i poziom oczyszczenia RNA sprawdzono metodą spektrofotometryczną, poprzez pomiar absorbancji przy długości światła 260 nm i 280 nm (stosunek wartości pomiarów 260/280 między 1,8 a 2,0). Integralność cząsteczek 18S i 28S rRNA oceniono metodą elektroforetyczną, poprzez rozdział w 2% żelu agarozowym (stosunek poziomu fluorescencji prążków 28S/18S co najmniej 2,0).

3.2.3. RT-qPCR

Do analizy względnej ekspresji genów w obu eksperymentach wykorzystano metodę odwrotnej transkrypcji w połączeniu z ilościowym PCR (RT-qPCR Reverse Transcription – quantitative PCR), którą przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie wykonano syntezę cDNA na bazie całkowitego RNA, z wykorzystaniem kitu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific/Fermentas, Wilno, Litwa) W drugim etapie przeprowadzono reakcje qPCR, w oparciu o uzyskane cDNA. Do tego celu wykorzystano kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific/Fermentas, Wilno, Litwa). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze LightCycler® 480 II (Roche Molecular Systems, Bazylea, Szwajcaria). Amplifikacja qPCR obejmowała początkowy etap denaturacji przez 15 min w 95°C, a następnie 40 cykli denaturacji (10s w 95°C), przyłączenie starterów (15s w 58°C, dla genu IL-12p40 zastosowano 65°C) i elongacja starterów (30s w 72°C). Fluorescencję mierzono na końcu każdego etapu elongacji starterów. Program termiczny został uzupełniony w krzywą topnienia, która została wygenerowana przez zwiększenie temperatury w małych przyrostach do 98°C i pomiar fluorescencji topniejącego amplikonu. Każda reakcja RT-qPCR została przeprowadzona w dwóch (**P-1** i **P-2** geny badane) lub trzech (**P-2** geny referencyjne) powtórzeniach technicznych.

3.2.4. Geny referencyjne

Do normalizacji obliczeń w doświadczeniu opisanym w publikacji (**P-1**) wykorzystano średnią geometryczną wartości Ct dla genów *ACTB* (beta-aktyna) i *UB* (ubikwityna). Geny te są związane z podstawowym metabolizmem i zostały wybrane na podstawie wcześniejszego doświadczenia, w którym zastosowano podobny układ eksperymentalny (Sławinska i in. 2019). Dla eksperymentu (**P-2**) konieczne było ustalenie, jaki zestaw genów będzie najlepszy do normalizacji badanych genów. W tym celu, na podstawie dostępnej literatury wytypowano kandydujące geny referencyjne: *ACTB* (beta-aktyna), *EF-1α* (Czynnik elongacyjny 1-alfa), *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego), *18S rRNA* (gen małej podjednostki rybosomalnego RNA) oraz *40s s11* (gen białka rybosomalnego 40s s11). Sekwencje poszczególnych starterów przedstawiono w publikacji (**P-2**). Dla każdego z wytypowanych genów przeprowadzono reakcję RT-qPCR oraz obliczenia przy pomocy następujących algorytmów: metody porównawczej delta Ct, BestKeeper, NormFinder oraz GeNorm. Dzięki temu ustalono, że genami referencyjnymi wykazującymi najwyższą stabilność w badanym układzie eksperymentalnym były *ACTB* i *40s s11* (**P-2**).

3.2.5. Geny badane

Systemowa odpowiedź immunologiczna opisana w publikacji (**P-1**) była wyrażoną jako zmiana względnej ekspresji genów w śledzionie. Oceniono modulację ekspresji dwóch paneli genów, opracowanych przez Slawinska i in. (2019b). W ich skład weszły następujące geny:

1. Panel genów związany z odpowiedzią immunologiczną:

- Interleukina 2 (*IL-2*),
- Interleukina 4 (*IL-4*),
- Interleukina 6 (*IL-6*),
- Interleukina 10 (*IL-10*),
- Interleukina 12 podjednostka 40 (*IL-12p40*),
- Interleukina 17 (*IL-17*).

2. Panel genów związany z odpowiedzią na stres:

- Białko Szoku Ciepłego, podjednostka mała 25 (*HSP25*),
- Białko Szoku Ciepłego 90-alfa (*HSP90AA1*),
- BAG białko opiekuńcze 3 (*BAG3*),
- Katalaza (*CAT*),
- Dysmutaza ponadtlenkowa (*SOD1*).

Panele genów związane z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w SALT karpia (**P-2**) wytypowano na podstawie literatury odnoszącej się do komponentów obecnych w śluzie skórnym karpia, stanowiących pierwszą linię obrony przeciwko patogenom i stresorom obecnym w środowisku wodnym. Poszczególne komponenty nieswoistej odpowiedzi immunologicznej aktywowanej w SALT pogrupowano i wybrano geny reprezentatywne dla danego procesu. W ten sposób stworzono unikatowy panel genów. Funkcje genów oraz sekwencje nukleotydowe starterów użytych do reakcji RT-qPCR przedstawiono w publikacji (**P-2**). Panel genów zawierał:

1. Białko ostrej fazy

- Białko c-reaktywne (CRP).

2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

- Histon H2Av 5-podobnej (*His2Av*),
- Białko glutaminowej gamma-glutamylotransferazy 5-podobnej (*GGGT5L*).

3. Cytokiny

- Interleukina 1-beta (*IL-1β*),
- Interleukina 4 (*IL-4*),
- Interleukina 8 (*IL-8*),
- Interleukina 10 (*IL-10*),
- Interferon gamma (*IFNγ*).

4. Lektyny

- Lektyna 4 typu C (*CLEC4M*).

5. Lizozymy

- Lizozym typu G (*LyzG*),
- Lizozym typu C (*LyzC*).

6. Mucyna

- Mucyna 5 AC (*M5ACL*).

7. Peroksydaza

- Mieloperoksydaza (*MPO*).

8. Proteazy

- Katepsyna B (*CTSB*),
- Katepsyna D (*CTSD*).

9. Oksydoreduktaza

- Tiodoksyna (*TXNL*).

3.2.6. Względna analiza ekspresji genów

Metodą obliczeniową służącą do uzyskania wyników względnej ekspresji genów był algorytm $\Delta\Delta Ct$ (delta delta threshold cycle/delta delta wartość progowa) zaproponowany przez Livak i Schmittgen (2001). Metoda ta bazuje na wartościach Ct (threshold cycle/wartość progowa) uzyskanych w reakcji RT-qPCR. Względną ekspresję genów wyrażono jako zmianę krotności (FC –fold change). Metoda $\Delta\Delta Ct$ wymaga obecności kontroli wewnętrznej dla eksperymentu (kalibratora). Wartości $\log_2 FC$ w obu eksperymentach przedstawiono w formie wykresów sporządzonych przy pomocy oprogramowania GraphPad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3.2.7. Analiza statystyczna

Otrzymane wartości dCt (delta Ct) dla badanych genów przeanalizowano w aplikacji SAS Enterprise Guide 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). W doświadczeniu opisanym w publikacji (**P-1**) przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji z interakcją (dwuczynnikowa ANOVA) w dwóch modelach. W pierwszym modelu rozpatrzono wpływ iniekcji *in ovo* (sól fizjologiczna vs. GOS), temperatury otoczenia zwierząt (warunki termoneutralne vs. stres cieplny) oraz wpływ interakcji obu czynników na względną ekspresję badanych genów. Procedurę wykonano osobno dla zestawów danych obejmujących stres cieplny na poziomie ostrym i chronicznym. W drugim modelu sprawdzono wpływ iniekcji *in ovo* (sól fizjologiczna vs. GOS), wpływ rodzaju zastosowanego temperaturowego czynnika stresowego (stres cieplny ostry vs. stres cieplny chroniczny) oraz interakcji obu czynników na względną ekspresję badanych genów. Wpływ czynnika lub interakcji czynników uznano za istotny statystycznie gdy $p < 0,05$. W celu przedstawienia różnic statystycznych w poziomie względnej ekspresji genów (wyrażonej jako $\log_2 FC$) między grupami przeprowadzono test t-Studenta. Różnice istotne statystycznie wykazano, gdy $p < 0,05$ (**P-1**). Ze względu na układ eksperymentu przedstawionego w publikacji (**P-2**), porównanie dwóch równych i niezależnych grup wykonano testem t- Studenta, z wartością $p < 0,05$ dla istotnych różnic.

3.3. WYNIKI

3.3.1. Efekt stymulacji *in ovo* oraz temperatury otoczenia na badane geny

Przeprowadzona dwuczynnikowa analiza wariancji w doświadczeniu (**P-1**) pozwoliła na przeanalizowanie wpływu zastosowanych czynników (stymulacja *in ovo* i temperatura otoczenia) na zmianę poziomu mRNA w śledzionie. Analizy przeprowadzono niezależnie dla stresu cieplnego ostrego i chronicznego. W części eksperymentu związanym z ostrym stresem cieplnym, ustalono, że istotną zmianą poziomu względnej ekspresji wykazał się gen *IL-4*, którego ekspresja była zależna od stymulacji *in ovo* ($p < 0,001$), temperatury otoczenia ($p < 0,05$) oraz interakcji obu tych czynników ($p < 0,01$). W tej samej grupie (ostry stres cieplny), na skutek stymulacji *in ovo*, istotne różnice wykazano dla genów związanych ze stresem *BAG3*, *CAT* i *SOD* ($p < 0,05$). W przypadku części eksperymentu, gdzie jako czynnik stresowy zastosowano chroniczny stres cieplny, GOS wywołał immunomodulujący efekt regulując poziom ekspresji genu *IL-2* ($p < 0,05$) i *IL-4* ($p < 0,001$). Natomiast, czynnik temperaturowy znacząco modulował ekspresję *IL-4* ($p < 0,01$) i *IL-12p40* ($p < 0,05$). Na skutek interakcji obu czynników, zmianom uległy geny związane ze stresem oksydacyjnym, *CAT* i *SOD* ($p < 0,01$).

3.3.2. Efekt stymulacji *in ovo* oraz formy stresu cieplnego na badane geny

W drugim modelu analizy wariancji (**P-1**) sprawdzono, jaki wpływ na ekspresję genów w śledzionie kur wolno rosnących wywarła stymulacja *in ovo* oraz rodzaj stresu cieplnego (ostry oraz chroniczny). Analizy przeprowadzono dla zbioru danych obejmujących zarówno wyniki dla stresu ostrego, jak i chronicznego z pominięciem danych dla warunków termoneutralnych. Dzięki temu ustalono czy rodzaj zastosowanego stresu cieplnego (ostry oraz chroniczny) wpływa na poziom ekspresji badanych genów. W rezultacie stymulacja *in ovo* (GOS vs. sól fizjologiczna) wywarła istotny immunomodulujący wpływ tylko na gen *IL-4* ($p < 0,001$), co zostało również wykazane w pierwszym przeprowadzonym modelu analizy wariancji omówionym w podrozdziale 4.2. Rodzaj zastosowanego stresu cieplnego (stres ostry vs. stres chroniczny) wpłynął na poziom względnej ekspresji genu *IL-2* ($p < 0,05$) oraz aktywował zmianę dla poziomu genu białka szoku cieplnego *HSP25* ($p < 0,05$), czego nie zaobserwowano przy porównaniu wpływu warunków termo neutralnych z warunkami o podniesionej temperaturze otoczenia. Interakcja pomiędzy stymulacją *in ovo* (GOS vs. sól fizjologiczna) oraz rodzajem zastosowanego stresu cieplnego (stres ostry vs. stres chroniczny), wywarła modulujący wpływ na poziom względnej ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny, w tym *CAT* i *SOD* ($p < 0,05$).

3.3.3. Profil względnej ekspresji genów w odpowiedzi na stres cieplny

W celu ustalenia, jaki efekt na względną ekspresję genów, wyrażoną w \log_2FC , wywiera stres cieplny (**P-1**), porównano grupy iniekowane solą fizjologiczną ale utrzymywane w odmiennych warunkach (warunki termoneutralne vs. stres cieplny). Na tej podstawie stwierdzono, że ostry stres cieplny nie wpłynął na zmianę ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz odpowiedzią na stres u kurcząt wolno rosnących. Z drugiej strony, chroniczny stres cieplny aktywował niektóre geny związane z odpornością w tym cytokinę przeciwzapalną *IL-10* ($\log_2FC = 1,88$, $p < 0,05$) i prozapalną *IL-12p40* ($\log_2FC = 2,01$, $p < 0,05$) oraz geny związane z odpowiedzią na stres, *CAT* ($\log_2FC = 1,72$, $p < 0,01$) i *SOD* ($\log_2FC = 1,55$, $p < 0,05$).

3.3.4. Względna ekspresja genów po stymulacji *in ovo* w warunkach stresu cieplnego

GOS podany *in ovo* spowodował obniżenie poziom względnej ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz odpowiedzią na stres w warunkach stresu cieplnego (**P-1**). Najsilniejszy efekt dotyczył cytokiny *IL-4*, której poziom obniżył się na skutek podania GOS zarówno w stresie ostrym ($\log_2FC = -6,10, p < 0,01$), jak i chronicznym ($\log_2FC = -3,45, p < 0,01$). W efekcie podania GOS u ptaków utrzymywanych w chronicznym stresie cieplnym, obniżeniu uległ poziom mRNA genu *IL-12p40* ($\log_2FC = -1,13, p < 0,05$). Ponadto, stres oksydacyjny w śledzionie wywołany przez chroniczny stres cieplny, uległ zahamowaniu na skutek podania GOS *in ovo*. Ograniczenie stresu oksydacyjnego pod wpływem GOS zostało wyrażone obniżoną ekspresją genów *CAT* ($\log_2FC = -1,72, p < 0,05$) i *SOD* ($\log_2FC = -1,56, p < 0,05$).

3.3.5. Geny referencyjne dla błony śluzowej karpia

Wszystkie zastosowane metody (porównawcza metoda delta-Ct, BestKeeper, NormFinder i GeNorm), pozwalające na ustalenie poziomu stabilności ekspresji genów w śluzie skórnym karpia (**P-2**) wykazały, że najwyższą stabilność w badanej tkance osiągnęły geny: *40s s11* i *ACTB*. Ponadto, algorytm wykorzystywany przez GeNorm wskazał, że do dalszych obliczeń najbardziej optymalne będzie zastosowanie średniej geometrycznej z wartości Ct obu tych genów referencyjnych.

3.3.6. Wpływ suplementacji GOS na sygnatury ekspresji genów w SALT

Dodatek GOS w mieszance paszowej karpia (**P-2**) spowodował wzrost ekspresji mRNA większości badanych genów, w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyjątek stanowiły geny: *CRP* ($\log_2FC = -0,93, p < 0,01$) i *LyzC*, ($\log_2FC = -1,74, p > 0,05$). Wśród genów o podniesionej ekspresji, istotne statystycznie różnice w poziomie mRNA w śluzie skórnym wykazano dla genów *INF γ* ($\log_2FC = 2,05, p < 0,05$) i *LyzG* ($\log_2FC = 1,32, p < 0,05$). Co więcej, sugestywny trend statystyczny stwierdzono dla genu *MPO* ($\log_2FC = 1,41, 0,05 < p < 0,1$).

3.4. DYSKUSJA

Badania nad zmianami poziomu ekspresji genów na skutek różnych czynników środowiskowych daje wgląd w mechanizmy nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Immunomodulująca rola prebiotyków może być bezpośrednia, na skutek rozpoznania cząsteczki prebiotyku przez receptory komórek limfatycznych. Szersza rola prebiotyków w immunomodulacji jest pośrednia i wynika z selektywnej stymulacji mikrobioty, która wchodzi w interakcje z komórkami limfatycznymi organizmu gospodarza (Cerezuela, Meseguer, i Esteban 2011; Huynh i in. 2017). GOS jest prebiotykiem o działaniu immunomodulującym, którego efekty można stwierdzić w tkankach immunologicznych, takich błona śluzowa, odpowiadająca za pierwszą linię obrony przed czynnikami środowiskowymi (reakcja lokalna) lub śledziona (reakcja systemowa). Podstawą niniejszej dysertacji są wyniki uzyskane na podstawie dwóch eksperymentów, przeprowadzonych na gatunkach odległych filogenetycznie i różniących się środowiskiem życia. W eksperymentach tych wykorzystano ten sam prebiotyk i oceniono jego wpływ na ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w różnych układach eksperymentalnych. W publikacji **(P-1)** przeanalizowano wpływ stymulacji *in ovo* prebiotykiem GOS na ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną i odpowiedzią na stres cieplny u kurcząt. W publikacji **(P-2)** określono wpływ prebiotyku GOS podanego w formie dodatku paszowego na ekspresję genów związanych z błonami śluzowymi skóry u karpia.

3.4.1. Efekty podania GOS *in ovo* u kurcząt w odpowiedzi na stres cieplny

3.4.1.1. Regulacja sygnatur ekspresji cytokin

W publikacji **(P-1)** zbadano wpływ prebiotyku GOS na względną ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w warunkach stresu cieplnego. GOS podano w 12. dobie inkubacji jaj, z wykorzystaniem technologii *in ovo*. Sygnatury ekspresji genów oznaczono w śledzionie, która odgrywa kluczową rolę w układzie immunologicznym kurcząt (Zhang i in. 2017). Kinetyka ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w śledzionie stanowi informację o ogólnoustrojowej odpowiedzi na stres w tym na stres cieplny (Ohtsu i in. 2015), którego efekty w połączeniu ze stymulacją *in ovo* określono w tym eksperymencie. Przewód pokarmowy (GIT – gastrointestinal tract) jest szczególnie wrażliwy na stres cieplny. Stres cieplny wpływa negatywnie na homeostazę jelit powodując zmniejszanie wchłaniania składników odżywczych z pokarmu, przerwanie integralności ściany jelita oraz aktywację układu immunologicznego (Liu i in. 2009; Varasteh i in. 2015). W eksperymencie **(P-1)** określono reakcję kurcząt wolno rosnących na działanie indukowanego stresu cieplnego (ostrego i chronicznego). Stres na poziomie ostrym nie wywołał reakcji w postaci zmian sygnatur ekspresji analizowanych genów. Natomiast, stres chroniczny spowodował wzrost regulacji poziomu genów *IL-10* i *IL-12p40*. Między tymi cytokinami dochodzi do silnej negatywnej interakcji. Interleukina *IL-10* kieruje odpowiedź immunologiczną w stronę odpowiedzi Th2 (humoralnej), hamując tym samym odpowiedź Th1, a interleukina *IL-12p40* – w stronę Th1 (komórkowa), hamując Th2 (Ma i in. 2015). Wyjaśnienie aktywacji obydwu genów o przeciwstawnej funkcji nie jest jednoznaczne. Można przypuszczać, że wynika ona z aktywacji szlaku TLR2 w śledzionie kurcząt, wskutek przenikania bakterii Gram-dodatnich z jelit do ustroju gospodarza podczas stresu cieplnego (Heled, Fleischmann, i Epstein 2013). Różne ligandy bakteryjne mogą stymulować receptory TLR2 na różnych komórkach prezentujących antygen (limfocyty B, komórki dendrytyczne lub makrofagi) w śledzionie (Duell i in. 2012). Innym wyjaśnieniem może być wyzwolenie silnej odpowiedzi prozapalnej (za pośrednictwem *IL-12p40*) w wyniku endotoksemii, która jest równoważona przez cytokinę przeciwzapalną (*IL-10*) (Waal Malefyt i in. 1991).

Stres cieplny spowodował wzrost ekspresji genów *IL-10* oraz *IL-12p40*, natomiast wczesne podanie GOS doprowadził do obniżenia ekspresji mRNA obu cytokin. W badaniach Sławinska i in. (2019) wykazano, że GOS podany *in ovo* wpływa na wzrost ekspresji genów związanych z funkcją barierową w jelitach kurcząt brojlerów. Zachowanie integralności ściany jelit w trakcie działania czynników stresowych zabezpiecza organizm gospodarza przed napływem antygenów przez „nieszczelne jelita”, które prowadzą do ogólnoustrojowego zapalenia (Vancamelbeke i Vermeire 2017). Na tej podstawie można stwierdzić, że odpowiedź immunologiczna wywołana podniesioną temperaturą otoczenia u kurcząt wolno rosnących może być złagodzona przez wczesną stymulację mikrobioty przez GOS podany *in ovo*.

W wyniku działania obu wprowadzonych czynników (GOS podany *in ovo* oraz stres cieplny), interleukina IL-4 uległa inhibicji ekspresji na poziomie mRNA. Cytokina ta bierze udział w odporności humoralnej jako cytokina plejotropowa, która jest wytwarzana przez komórki typu Th2, bazofile i komórki tuczne w odpowiedzi na aktywację odpowiedniego receptora (Silva-Filho, Caruso-Neves, i Pinheiro 2014). Jej główną funkcją jest regulacja różnicowania się naiwnych limfocytów T stymulowanych antygenem oraz ekspresji specyficznej immunoglobuliny E (IgE) i immunoglobuliny G (IgG) przez komórki B (Keegan 1998). Przewlekły stres cieplny obniża poziom immunoglobuliny A (IgA) oraz IgG u kurcząt (Quinteiro-Filho i in. 2017). GOS dostarczony w czasie rozwoju embrionalnego do jaja może wpływać hamująco na odpowiedź typu Th2 podczas indukowanego stresu cieplnego u dorosłych osobników.

3.4.1.2. Regulacja szlaku antyoksydacyjnego

Na skutek działania czynników stresowych, dochodzi do akumulacji reaktywnych form tlenu (ROS - reactive oxygen species) w komórkach organizmu gospodarza. Pierwszą linią obrony przed szkodliwym działaniem ROS jest aktywacja wydzielania enzymów przeciwutleniających, w tym katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (Halliwell i Whiteman 2004). W eksperymencie opisanym w (P-1), podczas chronicznego stresu cieplnego doszło do podwyższenia ekspresji genów *CAT* i *SOD*. Razem z aktywowaną odpowiedzią przeciwzapalną (*IL-10*) i prozapalną (*IL-12p40*), reakcja ta może wskazywać na rozwój w organizmie łagodnego subklinicznego zapalenia. Stan ten, nazywany „OxInflammation”, zaburza naturalną homeostazę, co w konsekwencji może prowadzić do silnego ogólnoustrojowego zapalenia (Valacchi i in. 2018). Wyeliminowanie stresorów ze środowiska zwierząt jest niezwykle trudne. W związku z tym, zasadne wydaje się zwiększenie możliwości aklimatyzacyjnych, np. poprzez stymulację mikrobioty jelitowej. U kurcząt stymulowanych *in ovo* prebiotykami GOS stwierdzono obniżoną ekspresję genów *CAT* i *SOD*. Wskazuje to na zmniejszenie poziomu stresu oksydacyjnego u tych zwierząt. GOS podany *in ovo* ma działanie bifidogenne (tj. promuje rozwój bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*) i wypiera z niszy środowiska jelita ślepego bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (Sławinska i in. 2019). Bakterie *Lactobacillus* wyzwalają produkcję ROS zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Kumar i in. 2007). Można spekulować, że wcześniej podany GOS wpłynął na zmianę składu mikrobioty jelitowej kurcząt, co ograniczyło produkcję ROS przez komórki nabłonka jelit w czasie chronicznego stresu cieplnego.

3.4.1.3. Walidacja genów referencyjnych karpia

Kluczowym elementem doświadczenia (P-2) było ustalenie, jakie geny związane z metabolizmem podstawowym karpia zwyczajnego wykazują najwyższą stabilność w śluzie skórnym. Krok ten był niezbędny do przeprowadzenia analizy względnej ekspresji genów metodą $\Delta\Delta Ct$. W dostępnej literaturze brakowało jednoznacznej informacji na temat rekomendowanych genów referencyjnych dla skórnej błony śluzowej karpia. Z wytypowanych kandydujących genów referencyjnych (*ACTB*, *18s rRNA*, *40s s11*, *EF1a*

i *GAPDH*), do normalizacji reakcji RT-qPCR wybrano geny *ACTB* oraz *40s s11*. Geny te wykazały najwyższą stabilność w testowanym układzie doświadczalnym. Do dalszych analiz względnej ekspresji genów metodą $\Delta\Delta C_t$ wykorzystano średnią geometryczną wartości C_t obu genów. Gen *ACTB* kodujący beta-aktynę, należy do grupy aktyn wykazujących wysoką konserwatywność. Aktyny to białka odpowiadające za strukturę integralność i ruch komórek oraz za sygnalizację międzykomórkową. Białko ACTB jest ważnym elementem cytoszkieletu i występuje w większości komórek u kręgowców (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTB>). Białko kodowane przez gen *40s s11* jest członkiem rybosomalnych białek należących do rodziny S17P. Białka należące do tej rodziny stanowią komponenty małej podjednostki 40s rybosomu. Główną funkcją genu *40s s11* jest wiązanie RNA i rRNA (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPS11&keywords=40S,ribosomal,protein,S11>). Badania nad względną ekspresją genów przy wykorzystaniu techniki RT-qPCR, wymagają obecności kontroli wewnętrznej. W badaniach na karpkach najczęściej wykorzystywane są pojedynczo lub w układach podwójnych geny takie jak: *ACTB* (Mo i in. 2014), *B2M*, *18s*, *EF1 α* i *GAPDH* (Filby i Tyler 2007; Jorgensen i in. 2006; Julin, Johansen i Sommer 2009; McCurley i Callard 2008). Decyzja o tym jakiego genu lub zestawu genów użyć do normalizacji danych w badaniach nad ekspresją zależy głównie od pochodzenia analizowanej tkanki oraz wieku ryb. W badaniach Zhang i in., dotyczących stabilności genów kandydujących, testowaniu poddano karpie na różnych etapach rozwoju. Ustalono, że u dorosłych dwuletnich karpki, u których poziom ekspresji sprawdzono w 14 tkankach (serce, wątroba, nerka, przodomózgowie, gonady, mózdzek, jelito przednie, jelito grube, łuski, śledziona, płetwa, mięsień, oko, skrzela) najlepszym genem kandydującym do zastosowania w celu normalizacji obliczeń jest gen *40s (40s s11)*. Natomiast u młodocianych jednorocznych osobników zarekomendowano zastosowanie zestawu genów *18s rRNA/ACTB*. Badaniu poddano również larwy karpia, od których pod mikroskopem wypreparowano gonady, w których również oznaczono poziom ekspresji genów. Na tej podstawie wytypowano geny *GAPDH* oraz *40s* w układzie podwójnym. (Zhang i in. 2016). Pomimo szerokiego zakresu omówionego doświadczenia, zabrakło w nim danych dotyczących śluzu skórny karpki, które to zostały uzupełnione w niniejszej dysertacji (**P-2**).

3.4.1.4. Ekspresja genów w błonie śluzowej skóry karpia po podaniu GOS

Suplementacja mieszanki paszowej karpki prebiotykiem GOS spowodowała znaczny wzrost ekspresji genów związanych z układem immunologicznym, w tym odpowiedzią antywirusową, regulowaną poprzez działanie interferonów (IFN). INF γ jest cytokiną mającą funkcję immunomodulującą, niezbędną do obrony komórkowej organizmu. Wytwarzana jest przez limfocyty T oraz komórki NK (natural killer), jako dimeryzowana, rozpuszczalna glikoproteina (Yabu i in. 2011). W eksperymencie opisanym w publikacji (**P-2**), nastąpił również wzrost względnej ekspresji genu kodującego lizozym G (*LyzG*) w grupie ryb suplementowanych GOS. Ten czynnik przeciwdrobnoustrojowy odgrywa ważną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej ryb. Cząsteczki lizozymu mają zdolność katalizowania hydrolizy bakteryjnych wiązań glikozydowych. W wyniku suplementacji GOS, obniżeniu poziomu ekspresji uległ gen kodujący białko ostrej fazy (*CRP*) w porównaniu do grupy kontrolnej (niesuplementowanej). Białko CRP należy do rodziny białek rozpuszczalnych, które biorą udział w reakcji ostrej fazy na zranienie lub infekcję. Białko CRP może wiązać się z fosforylocholiną, pneumokokowym C-polisacharydem i fosfolipidami, a także ze związkami autogennymi, takimi jak apoptotyczne komponenty jądrowe i inne komponenty wewnątrzkomórkowe uwalniane po śmierci komórki (Hicks i in. 1992). Wiąże ono także szkodliwe cząsteczki, takie jak rtęć; zwiększa poziom fagocytozy i wyzwala klasyczny szlak aktywacji układu dopełniacza (Falco i in. 2012).

3.5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przeprowadzone eksperymenty, dotyczące wpływu prebiotyku GOS na kinetykę ekspresji genów związanych z układem immunologicznym u ptaków i ryb, pozwoliły na potwierdzenie postawionej hipotezy. GOS podany *in ovo* lub w paszy wpłynął na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym zarówno w modelu wolno rosnących kurcząt, jak i karpia utrzymywanych w akwakulturze. Ponadto, poszczególne eksperymenty pozwoliły zweryfikować hipotezy szczegółowe:

- (P-1) Prebiotyk GOS, podany *in ovo* w 12. dobie inkubacji jaj, wpłynął na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym w śledzionie kurcząt wolno rosnących (*Gallus gallus domesticus*) poddanych stresowi cieplnemu;
- (P-2) Prebiotyk GOS, zastosowany jako dodatek w mieszance paszowej, wpłynął na sygnatury ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w błonie śluzowej skóry karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*).

Z przeprowadzonych doświadczeń płyną następujące wnioski:

1. (P-1) Pod wpływem ostrego stresu cieplnego, kury wolno rosnące nie aktywują szlaków związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz odpowiedzią na stres w śledzionie, co może świadczyć o dobrej adaptacji tego genotypu do nagłych i krótkotrwałych wzrostów temperatury otoczenia;
2. (P-1) Na skutek działania stresu cieplnego o przebiegu chronicznym u kur wolnorosnących dochodzi do aktywacji odpowiedzi prozapalnej (nadekspresja *IL-12p40*) oraz przeciwzapalnej (nadekspresja *IL-10*). Ponadto, aktywacji ulegają geny związane ze stresem oksydacyjnym (*CAT* i *SOD*), w efekcie tego dochodzi do wywołania stanu „zapalenia oksydacyjnego” (z ang. OxInflammation);
3. (P-1) GOS podany *in ovo* w 12 dobie inkubacji jaj łagodzi stan „zapalenia oksydacyjnego” wywołanego u kur wolno rosnących indukowanym chronicznym stresem cieplnym. GOS podany *in ovo* obniża odpowiedź szlaku Th2 (obniżenie regulacji *IL-2*) zarówno w stresie cieplnym o przebiegu ostrym, jak i chronicznym;
4. (P-2) Najbardziej stabilnym zestawem genów referencyjnych do badań nad względną ekspresją genów (RT-qPCR) w śluzie skórnej młodocianych karpia zwyczajnych są geny *ACTB* i *40s s11*;
5. (P-2) Suplementacja karpia zwyczajnych prebiotykiem GOS wywołuje immunomodulujący efekt w błonie śluzowej skóry, poprzez obniżenie poziomu ekspresji genu *CRP* należącego do białek ostrej fazy oraz aktywację ekspresji genów *IFN γ* i *LyzG*, wpływających na poprawę właściwości przeciwwirusowych i antybakteryjnych.

3.6. LITERATURA

- [1] Baurhoo B., Phillip L., Ruiz-Feria C. A. (2007) Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult. Sci.* 86, 1070–1078.
- [2] Cerezuela R., Meseguer J., Esteban A. (2011) Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review.
- [3] Drozdowski L., Thomson A. B. R. (2006) Intestinal mucosal adaptation. WJG Press.
- [4] Duell B. L., Tan C. K., Carey A. J., Wu F., Cripps A. W., Ulett G. C. (2012) Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis.
- [5] Falco A., Cartwright J. R., Wiegertjes G. F., Hoole D. (2012) Molecular characterization and expression analysis of two new C-reactive protein genes from common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 37, 127–138.
- [6] Fast M., Sims D., Burka J., Mustafa A., Ross N. (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 132, 645–657.
- [7] Filby A. L., Tyler C. R. (2007) Appropriate „housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Mol. Biol.* 8, 10.
- [8] Gołęb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T. (2017) *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [9] Halliwell B., Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?
- [10] Heled Y., Fleischmann C., Epstein Y. (2013) Cytokines and their role in hyperthermia and heat stroke.
- [11] Hicks P. S., Saunero-Nava L., Clos T. W. Du, Mold C. (1992) Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway. *J. Immunol.* 149, 3689–94.
- [12] Hoseinifar S. H., Ahmadi A., Raeisi M., Hoseini S. M., Khalili M., Behnampour N. (2017) Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac. Res.* 48, 3298–3307.
- [13] Hoseinifar S. H., Mirvaghefi A., Amoozegar M. A., Merrifield D. L., Ringø E. (2015) In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquac. Nutr.* 23, 111–118.
- [14] Hoseinifar S. H., Zoheiri F., Dadar M., Rufchaei R., Ringø E. (2016) Dietary galactooligosaccharide elicits positive effects on non-specific immune parameters and growth performance in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* 56, 467–472.
- [15] Hughes R. A., Ali R. A., Mendoza M. A., Hassan H. M., Koci M. D. (2017) Impact of dietary galacto-oligosaccharide (GOS) on chicken’s gut microbiota, mucosal gene expression, and *Salmonella* colonization. *Front. Vet. Sci.* 4.
- [16] Huynh T.-G., Shiu Y.-L., Nguyen T.-P., Truong Q.-P., Chen J.-C., Liu C.-H. (2017) Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 64, 367–382.
- [17] Jorgensen S. M., Kleveland E. J., Grimholt U., Gjoen T. (2006) Validation of Reference Genes for Real-Time Polymerase Chain Reaction Studies in Atlantic Salmon. *Mar. Biotechnol.* 8, 398–408.
- [18] Julin K., Johansen L.-H., Sommer A.-I. (2009) Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *J. Virol. Methods* 162, 30–39.
- [19] Keegan A. D. (1998) Interleukin 4 Receptor. W: *Encycl. Immunol.*, 1453–1455, Elsevier.
- [20] Korzeniewski B. (1996) *Powstanie i ewolucja życia*. Erem Fosze, Rzeszów.

- [21] Kumar A., Wu H., Collier-Hyams L. S., Hansen J. M., Li T., Yamoah K., Pan Z. Q., Jones D. P., Neish A. S. (2007) Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J.* 26, 4457–4466.
- [22] Liu F., Yin J., Du M., Yan P., Xu J., Zhu X., Yu J. (2009) Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 87, 1941–1949.
- [23] Lorenzoni G. (2012) Poultry Diseases Influenced by Gastrointestinal Health.
- [24] Ma J., Feng Y., Xie W., Yang L., Li X. (2015) Immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.) following glyphosate-exposure. *Toxin Rev.* 34, 184–189.
- [25] McCurley A. T., Callard G. V. (2008) Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol. Biol.* 9, 102.
- [26] Miandare H. K., Farvardin S., Shabani A., Hoseinifar S. H., Ramezanzpour S. S. (2016) The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Shellfish Immunol.* 55, 479–483.
- [27] Mo F., Zhao J., Liu N., Cao L.-H., Jiang S.-X. (2014) Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of CYP4T expression in crucian carp. *Genet. Mol. Biol.* 37, 500–7.
- [28] Ohtsu H., Yamazaki M., Abe H., Murakami H., Toyomizu M. (2015) Heat stress modulates cytokine gene expression in the spleen of broiler chickens. *J. Poult. Sci.* 52, 282–287.
- [29] Oláh I., Nagy N., Vervelde L. (2013) Structure of the Avian Lymphoid System. W: *Avian Immunol.* Second Ed., 11–44, Elsevier Inc.
- [30] Quinteiro-Filho W. M., Calefi A. S., Cruz D. S. G., Aloia T. P. A., Zager A., Astolfi-Ferreira C. S., Piantino Ferreira J. A., Sharif S., Palermo-Neto J. (2017) Heat stress decreases expression of the cytokines, avian β -defensins 4 and 6 and Toll-like receptor 2 in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 186, 19–28.
- [31] Rauta P. R., Nayak B., Das S. (2012) Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Elsevier.
- [32] Roberfroid M., Gibson G. R., Hoyles L., McCartney A. L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M. J., L otoing L., Wittrant Y., Delzenne N. M., Cani P. D., Neyrinck A. M., Meheust A. (2010) Prebiotic effects: Metabolic and health benefits.
- [33] Silva-Filho J. L., Caruso-Neves C., Pinheiro A. A. S. (2014) IL-4: An important cytokine in determining the fate of T cells. *Biophys Rev.* 6 (1), 111-118.
- [34] Slawinska A., Dunislawska A., Plowiec A., Radomska M., Lachmanska J., Siwek M., Tavaniello S., Maiorano G. (2019a) Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLoS One* 14.
- [35] Slawinska A., Mendes S., Dunislawska A., Siwek M., Zampiga M., Sirri F., Meluzzi A., Tavaniello S., Maiorano G. (2019b) Avian model to mitigate gut-derived immune response and oxidative stress during heat. *BioSystems* 178, 10–15.
- [36] Slawinska A., Plowiec A., Siwek M., Jaroszewski M., Bednarczyk M. (2016) Long-Term Transcriptomic Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered In Ovo in Broiler Chickens. *PLoS One* 11, e0168899.
- [37] Sławińska A., Siwek M. (2010) Kura (*Gallus gallus*) - najnowsze osiągnięcia z zakresu genomiki. *Biotechnologia* 3, 36–46.
- [38] Slawinska A., Zampiga M., Sirri F., Meluzzi A., Bertocchi M., Tavaniello S., Maiorano G. (2020) Impact of galactooligosaccharides delivered in ovo on mitigating negative effects of heat stress on performance and welfare of broilers. *Poult. Sci.* 99, 407–415.
- [39] Sohail M. U., Ijaz A., Yousaf M. S., Ashraf K., Zaneb H., Aleem M., Rehman H. (2010) Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and lactobacillus-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. *Poult. Sci.* 89, 1934–1938.
- [40] Streilein J. W. (1983) Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* 80 Suppl, 12s-16s.

- [41] Suzuki K., Harasawa R., Yoshitake Y., Mitsuoka T. (1983) Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks. *Nippon juigaku zasshi. Japanese J. Vet. Sci.* 45, 331–338.
- [42] Swain P., Dash S., Sahoo P. K., Routray P., Sahoo S. K., Gupta S. D., Meher P. K., Sarangi N. (2007) Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 38–43.
- [43] Tavaniello S., Slawinska A., Prioriello D., Petrecca V., Bertocchi M., Zampiga M., Salvatori G., Maiorano G. (2020) Effect of galactooligosaccharides delivered in ovo on meat quality traits of broiler chickens exposed to heat stress. *Poult. Sci.* 99, 612–619.
- [44] Tzortzis G., Goulas A. K., Gibson G. R. (2005) Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 412–6.
- [45] Valacchi G., Virgili F., Cervellati C., Pecorelli A. (2018) OxInflammation: From subclinical condition to pathological biomarker. *Frontiers Media S.A.*
- [46] Vancamelbeke M., Vermeire S. (2017) The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Taylor and Francis Ltd.*
- [47] Varasteh S., Braber S., Akbari P., Garssen J., Fink-Gremmels J. (2015) Differences in Susceptibility to Heat Stress along the Chicken Intestine and the Protective Effects of Galacto-Oligosaccharides. *PLoS One* 10, e0138975.
- [48] Waal Malefyt R. De, Haanen J., Spits H., Koncarolo M. G., Velde A. Te, Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., Vries J. E. De (1991) Interleukin 10 (il-10) and viral il-10 strongly reduce antigen-specific human t cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down'egulation of class h major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174, 915–924.
- [49] Wang J. T., Li J. T., Zhang X. F., Sun X. W. (2012) Transcriptome analysis reveals the time of the fourth round of genome duplication in common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics* 13, 96.
- [50] Wang S., Wang Y., Ma J., Ding Y., Zhang S. (2011) Phosvitin plays a critical role in the immunity of zebrafish embryos via acting as a pattern recognition receptor and an antimicrobial effector. *J. Biol. Chem.* 286, 22653–64.
- [51] Wang W. C., Yan F. F., Hu J. Y., Amen O. A., Cheng H. W. (2018) Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 96, 1654–1666.
- [52] Xu Z., Parra D., Gomez D., Salinas I., Zhang Y.-A., Gersdorff Jorgensen L. von, Heinecke R. D., Buchmann K., LaPatra S., Sunyer J. O. (2013) Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13097–13102.
- [53] Yabu T., Toda H., Shibasaki Y., Araki K., Yamashita M., Anzai H., Mano N., Masuhiro Y., Hanazawa S., Shiba H., Moritomo T., Nakanishi T. (2011) Antiviral protection mechanisms mediated by ginbuna crucian carp interferon gamma isoforms 1 and 2 through two distinct interferon gamma-receptors. *J. Biochem.* 150, 635–648.
- [54] Yegani M., Korver D. R. (2008) Factors affecting intestinal health in poultry. *Oxford University Press.*
- [55] Zhang Q., Sun X., Wang T., Chen B., Huang Y., Chen H., Chen Q. (2019) The Postembryonic Development of the Immunological Barrier in the Chicken Spleens.
- [56] Zhang Q., Waqas Y., Yang P., Sun X., Liu Y., Ahmed N., Chen B., Li Q., Hu L., Huang Y., Chen H., Hu B., Chen Q. (2017) Cytological study on the regulation of lymphocyte homing in the chicken spleen during LPS stimulation. *Oncotarget* 8, 7405–7419.
- [57] Zhang W., Jia Y., Ji X., Zhang R., Liang T., Du Q., Chang Z. (2016) Optimal reference genes in different tissues, gender, and gonad of Yellow River carp (*Cyprinus carpio* var) at various developmental periods. *Pak. J. Zool.* 48, 1615–1622.
- [58] Ziółkowska E., Bogucka J., Dankowiakowska A., Rawski M., Mazurkiewicz J., Stanek M. (2020) Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anim.* 2020, Vol. 10, Page 723 10, 723.

3. STRESZCZENIE

Wpływ galaktooligosacharydów na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym ptaków i ryb

mgr inż. Elżbieta Pietrzak

Słowa kluczowe: ekspresja genów; GOS; odpowiedź immunologiczna nieswoista; odpowiedź systemowa; SALT

Ptaki (*Aves*) i ryby kostnoszkieletowe (*Osteichthyes*) to kręgowce odległe od siebie filogenetycznie, żyjące w różnych środowiskach i o odmiennej anatomii i fizjologii. Jednak, współdzielą one drogę ewolucyjną, co sprawia, że niektóre elementy rozwojowe, takie jak układ immunologiczny, wykazują pewne podobieństwa. Mikrobiota zasiedlająca przewód pokarmowy (GIT – gastrointestinal tract) odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu gospodarza. Ścisła zależność między mikrobiotą a organizmem gospodarza wykształciła się w procesie koewolucji. Mikrobiota jelitowa to złożona populacja mikroorganizmów zasiedlających światło i ściany jelita, biorąca udział w trawieniu i fermentacji węglowodanów, produkcji witamin, utrzymaniu prawidłowej funkcji kosmków jelitowych, ochronie przed drobnoustrojami chorobotwórczymi oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej. Prebiotyki, jako selektywna pożywka dla mikroorganizmów zamieszkujących GIT, zapewniają odpowiedni skład gatunkowy mikrobioty oraz wpływają na jej aktywność. Galaktooligosacharydy (GOS) to funkcjonalne oligosacharydy, które regulują skład mikrobioty jelitowej oraz modulują odpowiedź immunologiczną gospodarza. **Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu GOS na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym ptaków i ryb.**

Wczesna stymulacja mikrobioty kurcząt przy pomocy GOS podanego w 12. dobie inkubacji jaj z wykorzystaniem technologii *in ovo* (**P-1**) wpływa korzystnie na skład mikrobioty jelitowej. Korzystny profil mikrobioty pozwala zachować prawidłowe funkcje błony śluzowej jelit, takie jak produkcja śluzu, czy zachowanie szczelności nabłonka jelitowego. Nabłonek jelitowy jest szczególnie wrażliwy na niekorzystne warunki środowiska i może utracić swoje właściwości na skutek czynników zewnętrznych, takich jak stres cieplny, często towarzyszący produkcji drobiarskiej. Wpływ GOS na modulację ekspresji genów

związanych z układem immunologicznym kury (*Gallus gallus domesticus*) po indukowanym stresie cieplnym był przedmiotem badań raportowanych w **(P-1)**. Kury wolno rosnące poddano stymulacji prebiotykami GOS z wykorzystaniem technologii *in ovo* w 12. dobie inkubacji jaj, a stres cieplny został wprowadzony w 36 dobie życia kurcząt na 8 godzin (stres cieplny ostry) lub na 14 dni (stres cieplny chroniczny).

Ryby żyjące w środowisku wodnym są bezpośrednio narażone na różne czynniki stresowe. W związku z tym, kluczowym mechanizmem obronnym jest dla nich wyspecjalizowana warstwa śluzowa skóry o dużej aktywności immunologicznej. Dodatek GOS do regularnej mieszanki paszowej w żywieniu ryb **(P-2)** pozwala promować korzystne bakterie jelitowe, które mogą stymulować właściwości ochronne w tkance limfatycznej związanej ze skórą (SALT – skin-associated lymphoid tissue) ryb. Publikacja **(P-2)** dotyczy wpływu suplementacji GOS w trakcie 50-dniowego odchowu rocznych ryb z gatunku karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*).

W obydwu doświadczeniach, po zakończonym odchowcie, zwierzęta poddano eutanazji i pobrano tkanki immunologiczne, tj. fragment śledziony **(P-1)** i śluz skórny **(P-2)**. Z pobranych tkanek wyizolowano RNA, który posłużył jako matryca do reakcji RT-qPCR. Względną ekspresję genów związanych z układem immunologicznym obliczono metodą $\Delta\Delta Ct$. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Wyniki publikacji **(P-1)** wykazały, że GOS wpłynął na modulację odpowiedzi immunologicznej w śledzionie kur wolno rosnących po indukowanym stresie cieplnym. Obniżeniu uległa ekspresja genów: IL-4 (stres ostry $p < 0.001$; chroniczny $p < 0.01$), IL-12p40, CAT i SOD (stres chroniczny $p < 0.05$). Z kolei, wyniki publikacji **(P-2)** wykazały, że GOS podany w paszy zmienił ekspresję genów w tkance SALT karpia, co przejawiało się obniżeniem ekspresji genu CRP ($p < 0.01$) oraz wzrostem ekspresji genów INF γ ($p < 0.05$) i LyzG ($p < 0.05$).

Stosowanie prebiotyku GOS w praktyce hodowlanej zwierząt, poprzez wczesną stymulację mikrobioty jelitowej z wykorzystaniem metody *in ovo* lub podanie jako dodatek paszowy, może przyczynić się do poprawy zdrowotności zwierząt w produkcji drobiarskiej oraz w akwakulturze.

4. ABSTRACT

Impact of galactooligosaccharides on immune-related gene expression signatures in birds and fish

Elżbieta Pietrzak, MSc.

Key words: gene expression; GOS; innate immune response; systemic response; SALT

Birds (*Aves*) and skeletal fish (*Osteichthyes*) are phylogenetically divergent vertebrates, living in different environments, and characterized by distinct anatomy and physiology. However, they share common evolutionary pathway and retained similarities in some bodily functions such as immune system. Microbiota inhabiting gastrointestinal tract (GIT) plays a key role in maintaining host homeostasis. A close relationship between microbiota and its host was developed during co-evolution of both systems. Intestinal microbiota is a complex population of microorganisms, whose functions include digestion and fermentation of carbohydrates, vitamin production, maintenance of the required intestinal villi functions, protection against pathogenic microorganisms, and regulation of the immune responses. Prebiotics are a selective medium for GIT microbiota, and as such they influence microbiota composition and activity. Galactooligosaccharides (GOS) are functional oligosaccharides that regulate the composition of the intestinal microbiota and modulate the immune responses of the host. **The aim of this doctoral thesis was to determine the effects of GOS on the immune-related gene expression in birds and fish.**

Early stimulation with GOS carried out on day 12 of egg incubation with *in ovo* technology improves composition of the intestinal microbiota, which is formed in the perinatal period (**P-1**). Beneficial profile of microbiota contributes to proper functions of the intestinal mucosa, including mucus production or maintaining the barrier function, which may lose its properties due to environmental challenge, such as heat stress. The effects of GOS on the modulation of immune-related gene expression in chickens (*Gallus gallus domesticus*) exposed to heat stress was reported in (**P-1**). Slow-growing chickens were stimulated with GOS prebiotic through *in ovo* technology applied on day 12 of egg

incubation. Heat stress was induced on day 36 post-hatching and lasted 8 hours (acute heat stress) or 14 days (chronic heat stress).

The aquatic environment contains various stressors, to which fish are constantly exposed. The key defense mechanism for fish is a specialized mucous layer of the skin with high immunological activity, i.e., skin-associated lymphoid tissue (SALT). Supplementing the regular feed mix with GOS in fish nutrition promotes growth of beneficial intestinal bacteria that can have immunostimulatory effects in all mucosal tissues, including SALT (**P-2**). Paper (**P-2**) presents the effects of GOS supplemented in-feed for 50 days in common carp (*Cyprinus carpio*).

In both experiments, the animals were euthanized and lymphoid tissues were collected. The spleen (**P-1**) and cutaneous mucus (**P-2**) were sampled. RNA was isolated from harvested tissues and used for RT-qPCR. Relative immune-related gene expression was calculated with $\Delta\Delta C_t$ algorithm. The obtained results were statistically analyzed. The results from paper (**P-1**) indicate that GOS modulates immune-related gene expression in spleen of slow-growing chickens challenged with heat. The gene expression of IL-4 (acute stress $p < 0.001$; chronic $p < 0.01$), IL-12p40, CAT and SOD (chronic stress $p < 0.05$) was down-regulated in GOS-stimulated chickens. The result reported in paper (**P-2**) show that GOS supplemented in-feed modulated gene expression in SALT in carp. The gene CRP ($p < 0.01$) was down-regulated, while genes INF γ ($p < 0.05$) and LyzG ($p < 0.05$) were down-regulated. The use of GOS prebiotic in animal farming through in-ovo delivery or in-feed supplementation, contributes to animal health in poultry production and in aquaculture.

5. ZAŁĄCZNIKI

**5.1. KOPIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Article

Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat

Elzbieta Pietrzak ¹, Aleksandra Dunislawska ¹, Maria Siwek ¹, Marco Zampiga ², Federico Sirri ², Adele Meluzzi ², Siria Tavaniello ³, Giuseppe Maiorano ³ and Anna Slawinska ^{1,*}

¹ Department of Animal Biotechnology and Genetics, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland; elzbieta.pietrzak@utp.edu.pl (E.P.); aleksandra.dunislawska@utp.edu.pl (A.D.); siwek@utp.edu.pl (M.S.)

² Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Via del Florio 2, 40064 Ozzano dell'Emilia, Italy; marco.zampiga2@unibo.it (M.Z.); federico.sirri@unibo.it (F.S.); adele.meluzzi@unibo.it (A.M.)

³ Department of Agricultural, Environmental and Food Sciences, University of Molise, Via F. de Sanctis snc, 86100 Campobasso, Italy; siria.tavaniello@unimol.it (S.T.); maior@unimol.it (G.M.)

* Correspondence: slawinska@utp.edu.pl; Tel.: +48-052-374-97-50

Received: 7 February 2020; Accepted: 9 March 2020; Published: 12 March 2020

Simple Summary: The exposure of animals to excessive heat leads to heat stress, heat stroke, or even death. The first negative effects of heat exposure occur in the gut. The elevated temperature leads to damage in intestinal walls and shifts in the composition of intestinal microbiota. In effect, the gut content (mainly intestinal microbiota and their metabolites) leaks through compromised intestinal walls into milieu of the body. Prebiotics (e.g., GOS—galactooligosaccharides) can be used to mitigate the negative effects of the heat stress in poultry. GOS that are delivered in ovo on day 12 of egg incubation stimulates the development of healthy intestinal microbiota in a chicken embryo. Healthy intestinal microbiota enhances the barrier function of the gut and the immune system. Chickens were originally domesticated in southeast Asia and are therefore genetically adapted to handle high temperatures. However, genetic selection towards performance leads to sensitization to high ambient temperature. In this paper, we studied slow-growing chickens with a reputation for heat resistance. We used in ovo stimulation with the GOS prebiotic that was delivered in ovo to promote healthy gut microbiota. In this manner, we combine genetics and environment to describe a model of heat resistance in poultry.

Abstract: Galactooligosaccharides (GOS) that are delivered in ovo improve intestinal microbiota composition and mitigate the negative effects of heat stress in broiler chickens. Hubbard hybrids are slow-growing chickens with a high resistance to heat. In this paper, we determined the impact of GOS delivered in ovo on slow-growing chickens that are challenged with heat. The experiment was a 2 × 2 × 2 factorial design. On day 12 of incubation, GOS (3.5 mg/egg) was delivered into the egg (n = 300). Controls (C) were mock-injected with physiological saline (n = 300). After hatching, the GOS and C groups were split into thermal groups: thermoneutral (TN) and heat stress (HS). HS (30 °C) lasted for 14 days (days 36–50 post-hatching). The spleen (n = 8) was sampled after acute (8.5 h) and chronic (14 days) HS. The gene expression of immune-related (*IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12p40*, and *IL-17*) and stress-related genes (*HSP25*, *HSP90AA1*, *BAG3*, *CAT*, and *SOD*) was detected with RT-qPCR. Chronic HS up-regulated the expression of the genes: *IL-10*, *IL-12p40*, *SOD* ($p < 0.05$), and *CAT* ($p < 0.01$). GOS delivered in ovo down-regulated *IL-4* (acute $p < 0.001$; chronic $p < 0.01$), *IL-12p40*, *CAT* and *SOD* (chronic $p < 0.05$). The obtained results suggest that slow-growing hybrids are resistant to acute heat and tolerant to chronic heat, which can be supported with in ovo GOS administration.

Keywords: GOS; prebiotic; in ovo stimulation; heat; immune response; spleen

1. Introduction

Acute and chronic thermal stress significantly hinders the growth performance of poultry [1]. This is due to the fact that the feed intake of chickens that are reared in intensive poultry farms is negatively correlated with environmental temperature [2]. The main ancestor of the domestic chicken is red junglefowl (*Gallus gallus*) from the hot jungle climate of Southeast Asia [3]. However, intensive genetic selection for growth and feed efficiency leads to an increased sensitivity of heavy-weight broilers to environmental conditions, including ambient temperature [4]. There is a negative correlation between heat tolerance and growth rate [5]. Fast-growing broilers produce more heat and have a higher heat load [6], which reduces feed intake and growth parameters [7–9]. Heat stress (HS) could lead to meat quality issues due to increased ante- and post-mortem glycolytic metabolisms coupled with a reduced protein synthesis and turnover, enhanced fat deposition, and the overproduction of reactive oxygen species [10]. The gastrointestinal tract (GIT) is also very responsive to heat, which alters intestinal microbiota composition [11] and decreases the integrity of the intestinal epithelium [12]. Since exposure to high temperatures is difficult to avoid in intensive production systems, losses in the production and mortality are high [13]. The negative effects of HS in poultry are due to high animal stocking, the insufficient ventilation of poultry houses, as well as geographical factors [14]. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) reports clearly show that the climate is warming [15]. Problems related to maintaining optimal temperatures in poultry houses will become more challenging, especially during predicted heat waves, even in moderate climates. HS leads to behavioral, biochemical, and physiological changes. Responses to heat vastly depend on the genetic adaptation of the individual [16] but also on environmental factors, such as intestinal microbiota [17]. Compromised genetic or environmental conditions result in poorer thermoregulation [18].

Heat-resistance depends on the genetic adaptation of the chickens. Native chickens from tropical and sub-tropical regions are more tolerant to high ambient temperatures than fast-growing lines [19,20]. Since they are smaller and lighter and have not been subjected to selective pressure for meat-related traits, they have retained their genetic adaptation to handle high temperatures. Studies on Brazilian breeds (Pelaco and Caneluda) [18] and Egyptian breeds (Fayoumi, Dandarawi, and Sinai) [21] have shown a good tolerance to elevated ambient temperature, manifested by the increased expression of heat shock proteins (HSP). In some countries, native breeds are crossbred with commercial broiler lines to obtain heat-resistant hybrids with good meat production [22]. The hybrids that were used in our experiment are slow-growing free-range chickens that are obtained by crossing a Hubbard RedBro male with a Hubbard JA57 (<https://www.hubbardbreeders.com/products/crosses/ja57/>) female. These free-range poultry hybrids are distinguished by a good adaptation to a warm climate and a high disease resistance (Federico Sirri, unpublished data).

HS in poultry influences the composition of intestinal microbiota [23], leading to gut dysbiosis [24]. Unstable microbiota impairs the morphology and barrier function of the GIT [25]. Feed additives such as prebiotics support the gut microbiota under stressful conditions [26–28]. Prebiotic and probiotic supplementation allow for the maintenance of stable microbiota populations in the gut [29] and prevent “leaky guts” [30]. One of the most efficient ways to improve intestinal microbiota composition in poultry is in ovo stimulation. It allows for the precise introduction of a specific substance directly into the internal environment of the incubating egg. During in ovo stimulation, a prebiotic or synbiotic is injected into the air cell of the incubating egg (in this study, on day 12 of egg incubation) and stimulates the development of indigenous microbiota prior to hatching [31]. The prebiotic supplementation at the embryonic stage supports not only the microbiota development in the growing chickens [32–34] but also improves the immune system [35,36], gut morphology [37] and the intestinal barrier function [32].

The positive effect of GOS supplementation on the poultry intestinal microbiome has been demonstrated [38]. Galactooligosaccharides are potent prebiotics that exert beneficial effects on intestinal microbiota in chickens. Particularly interesting is the possibility of using *in ovo* technology for the early stimulation of the microbial communities with GOS [32,39,40]. The molecular data on broiler chickens have indicated that HS triggers systemic immune and stress responses, which are balanced by GOS that are delivered *in ovo* [41]. It also mitigates the negative effects of HS in broiler chickens on performance traits, including improved growth efficiency, feed efficiency [39], and meat quality [10]. In this study, we focused on chickens with a different genetic background, *i.e.*, slow-growing hybrids. The aim of this study was to assess the impact of GOS that were delivered *in ovo* on the modulation of the immune-related and stress-related gene expression signatures in the spleens of slow-growing chickens that were subjected to HS. Hereby, we hypothesize that the genetics of slow-growing chickens combined with *in ovo* stimulation with GOS will contribute to increased HS resistance.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Statement

The animal procedures were conducted in compliance with decision of the Ethical Committee in Rome (Italy), decision number 503/2016.

2.2. Experimental Trial and Tissue Collection

The experimental material was slow-growing crossbred Hubbard chickens. After 12 days of incubation, 300 eggs were injected with a single dose of 3.5 mg GOS/egg (GOS group) suspended in 0.2 mL of physiological saline into the air chamber. Controls (the C group) were mock-injected with sterile physiological saline ($n = 300$, volume 0.2 mL/egg). Injection was carried out according to the *in ovo* procedure [32]. After hatching, the GOS and C groups were divided into two subgroups: maintained in thermoneutral condition (TN) and under the HS condition. In all groups, chicks were sexed and vaccinated against coccidiosis, infectious bronchitis virus, Marek's disease virus, Newcastle disease, and Gumboro disease, and they received food and water *ad libitum*. The composition of the diets is presented in Table 1. Male chicks ($n = 600$, 300 per treatment) were transferred to an environmentally controlled poultry house and divided into 4 groups of 150 chicks/treatment/environmental condition. Each group was composed of 6 replicates of 25 birds each. HS had two forms: acute (on day 36, the temperature in the poultry house was raised to 30 °C for 8.5 h) and chronic (on day 36, the temperature was raised to 30 °C, and these conditions were maintained for 14 days). After that, 8 randomly selected animals from each group with an average body weight were slaughtered and dissected. Fragments of the spleen were collected in the tubes with 3 mL of an RNAlater solution (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for RNA stabilization and stored at -80 °C until further processing.

Table 1. Dietary formulation supplied in slow-growing chickens during three feeding phases.

Ingredient	Starter (0–14 d)	Grower (15–36 d)	Finisher (37–50 d)
Corn	42.17	34.96	12.73
White corn	0.00	0.00	15.00
Wheat	10.00	20.00	25.01
Sorghum	0.00	0.00	5.00
Soybean meal	23.11	20.63	17.60
Expanded soybean	10.00	10.00	13.00
Sunflower	3.00	3.00	3.00
Corn gluten	4.00	3.00	0.00
Soybean oil	3.08	4.43	5.48
Dicalcium phosphate	1.52	1.20	0.57
Calcium carbonate	0.91	0.65	0.52
Sodium bicarbonate	0.15	0.10	0.15

Salt	0.27	0.27	0.25
Coline chloride	0.10	0.10	0.10
Lysine sulfate	0.59	0.55	0.46
DL-methionine	0.27	0.29	0.30
Threonine	0.15	0.14	0.14
Enzyme-roxazyme g2g	0.08	0.08	0.08
Phytase 0.1%	0.10	0.10	0.10
Cocciostat			
Vit-min premix ¹	0.50	0.50	0.50
Dry matter, %	88.57	88.65	88.64
Protein, %	22.70	21.49	19.74
Lipid, %	7.06	8.24	9.74
Fiber, %	3.08	3.04	3.07
Ash, %	5.85	5.17	4.49
Lys, %	1.38	1.29	1.21
Met, %	0.67	0.62	0.59
Met + Cys, %	1.03	0.97	0.91
Calcium, %	0.91	0.80	0.59
Phosphate, %	0.63	0.57	0.46
Metabolizable energy (kcal/kg)	3.076	3.168	3.264

¹ Provided the following per kg of diet: vitamin A (retinyl acetate), 1,3000 IU; vitamin D3 (cholecalciferol), 4000 IU; vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate), 80 IU; vitamin K (menadione sodium bisulfite), 3 mg; riboflavin, 6.0 mg; pantothenic acid, 6.0 mg; niacin, 20 mg; pyridoxine, 2 mg; folic acid, 0.5 mg; biotin, 0.10 mg; thiamine, 2.5 mg; vitamin B₁₂ 20 μ g; Mn, 100 mg; Zn, 85 mg; Fe, 30 mg; Cu, 10 mg; I, 1.5 mg; Se, 0.2 mg; and ethoxyquin, 100 mg.

2.3. RNA Isolation

Total RNA was isolated from the spleen. Fragments of the spleen tissue were homogenized with the TissueRuptor homogenizer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) in TRIzol[®] LS Reagent (Ambion/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Further steps of RNA isolation and purification were performed with a commercial kit (Universal RNA Purification Kit, EURx, Gdansk, Poland). RNA quality and quantity were evaluated by using electrophoresis in 2% agarose gel and a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Scientific Nanodrop Products, Wilmington, NC, USA).

2.4. Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

Complementary DNA (cDNA) was synthesized by using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific/Fermentas, Vilnius, Lithuania), following the manufacturer's recommendations. Obtained cDNA was diluted to 70 ng/ μ L and stored at -20°C . RT-qPCR reactions were conducted with a total volume of 10 μ L. The reaction mixture included Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific/Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 μ M of each primer (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany), and 2 μ L of diluted cDNA. Thermal cycling was performed in a LightCycler II 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Each RT-qPCR reaction was conducted in two technical replicates. Gene expression analysis was performed for two gene panels, which were reported earlier [41]. The first gene panel was associated with the immune response and included the genes: *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12p40*, and *IL-17*. The second gene panel was associated with stress response and included the genes: *HSP25*, *HSP90AA1*, *BAG3*, *CAT*, and *SOD*. *UB* and *ACTB* were used as reference genes. The sequences of the primers that were used in this experiment are presented in Table 2.

2.5. Relative Quantification of Gene Expression and Statistical Analysis

The normalization of the expression levels (Ct – cycle threshold) of the target genes was performed with a geometric mean of the two reference genes (*UB* and *ACTB*). ΔCt was calculated by subtracting the Ct of the reference genes from the Ct of the target genes (Ct target – Ct reference). All

statistical analyses were based on ΔCt values. The full-factorial study design allowed us to analyze the impact of GOS that were delivered in ovo and different levels of HS on gene expression signatures in slow-growing hybrid chickens. The first statistical model was two-way ANOVA with interaction, in which in ovo treatment and ambient temperature (acute or chronic HS vs. TN) were considered independent variables (factors). In this analysis, the two time-points of tissue collection (day 36—acute HS and day 50—chronic HS) were independently analyzed. The second statistical model included in ovo treatment and HS (acute vs. chronic HS) as factors. In this model, the datasets from acute and chronic HS were combined. In both ANOVA analyses, the factors (or interaction between them) were considered significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$.

Relative gene expression was calculated with the $\Delta\Delta\text{Ct}$ algorithm. In the $\Delta\Delta\text{Ct}$ algorithm, a selected a calibrator (control ΔCt) was subtracted from the ΔCt of the experimental group. The fold change (FC) of the target gene in the experimental group vs. the control group was calculated according to the formula: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [42]. To visualize the pairwise differences between the treatment groups, the results of the log₂ fold change were graphed and compared with a Student's t-test. The pairwise comparisons were considered significant at $p < 0.05$. The calculations were performed in MS Excel and SAS Enterprise Guide 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Graphs were drawn by using Graph Pad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Table 2. List of target genes and primers sequences for RT-qPCR.

Gene ^a	NCBI Gene ID	Primer Sequences (5'-3')	Function ^b	Ref.
Panel 1. Immune-related genes				
<i>IL-2</i>	373958	F: GCTTATGGAGCATCTCTATCATCA R: GGTGCACTCCTGGGTCTC	Cytokine important for the proliferation of T and B lymphocytes. Important role in the immune response to antigenic stimuli.	[41]
<i>IL-4</i>	416330	F: GCTCTCAGTGCCGCTGATG R: GGAAACCTCTCCCTGGATGTC	Pleiotropic cytokine produced by activated T cells. B-cell stimulatory factor.	[43]
<i>IL-6</i>	395337	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R: TTGGCAGGTTGAGGTTGTT	Cytokine that plays a role in inflammation and the maturation of B cells. Produced at sites of acute and chronic inflammation.	[44]
<i>IL-10</i>	428264	F: CATGCTGCTGGCCCTGAA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	Pleiotropic effects in immunoregulation and inflammation. Inhibits synthesis of cytokines.	[45]
<i>IL-12p40</i>	404671	F: TTGCCGAAGAGCACCAGCCG R: CGGTGTGCTCCAGGCTTGGG	Can act as a growth factor for activated T and Natural Killer cells. Stimulates production of IFN-gamma.	[46]
<i>IL-17</i>	395111	F: GGGATTACAGGATCGATGAGGA R: GAGTTCACGCACCTGGAATG	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 8. Proinflammatory cytokine produced by activated T cells.	[41]
Panel 2. Stress response genes				
<i>HSP25</i>	428310	F: CCGTCTTCTGCTGAGAGGAGTG R: ACCGTTGTTCGTCATCAC	Heat shock protein family B (small) member 9. Response to various cellular stresses. Molecular chaperones which bind to and inhibit irreversible protein aggregation or misfolding under stressful conditions.	[47]
<i>HSP90AA1</i>	423463	F: GGTGTTGGTTCCTACTCTGCTTAC R: ACTGCTCATCATCATTGTGCTTGG	Heat shock protein family class A member 1. Is a molecular chaperone that aids protein folding and quality control for a large proteins.	[47]
<i>BAG3</i>	423931	F: AGGGTCGTGCGGATGTGC R: TGTGGTGGCTTAGGCTCTGC	BAG family molecular chaperone regulator 3. Cellular response to stress.	[47]
<i>CAT</i>	423600	F: GGGGAGCTGTTTACTGCAAG R: CTTCCATTGGCTATGGCATT	Catalase a key antioxidant enzyme in the bodies defense against oxidative stress.	[48]
<i>SOD1</i>	395938	F: AGGGGGTCATCCACTTCC R: CCCATTTGTGTTGTCTCCAA	Superoxide Dismutase binds copper and zinc ions. Responsible for destroying free superoxide radicals.	[48]
Reference genes				
<i>ACTB</i>	396526	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAGTGGTACG	Beta-actin is highly conserved protein involved in cell motility, structure, integrity and intercellular signaling. Ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	[49]
<i>UB</i>	101747587F	F: GGGATGCAGATCTTCGTGAAA R: CTTGCCAGCAAAGATCAACCTT	Ubiquitin is associated with protein degradation, DNA repair, cell cycle regulation kinase modification, and regulation of other cell signals pathways.	[49]

^a Annealing temperature for RT-qPCR was 58 °C except from *IL-12p40* (65 °C); ^b gene function derive from GeneCards (<http://www.genecards.org>).

3. Results

3.1. Effects of in ovo Treatment and Thermal Challenge on Gene Expression

The results of two-way ANOVA with interaction, using the first statistical model (GOS vs. C; HS vs. TN; GOS vs. C × HS vs. TN), are presented in Table 3. In acute HS, among the immune-related genes, only *IL-4* responded with differential messenger RNA (mRNA) expression to GOS treatment ($p < 0.001$), temperature ($p < 0.05$), and the interactions between those two factors ($p < 0.01$). GOS treatment modulated the expression of the stress-related genes: *BAG3*, *CAT* and *SOD* ($p < 0.05$). In chronic HS, GOS that were delivered in ovo had immunomodulatory effect on: *IL-2* ($p < 0.05$) and *IL-4* ($p < 0.001$). Temperature significantly modulated the expression of *IL-4* ($p < 0.01$) and *IL-12p40* ($p < 0.05$). GOS treatment, in interaction with the temperature, showed a modulatory effect on stress-related genes: *CAT* and *SOD* ($p < 0.01$).

Table 3. Effects of in ovo treatment and ambient temperature on gene expression signatures in the spleens of slow-growing chickens.

Gene	Treatment ¹	Temperature ²	Treatment × Temperature ³
Acute HS			
Immune-related panel			
<i>IL-2</i>	NS	NS	NS
<i>IL-4</i>	<0.001	<0.05	<0.01
<i>IL-6</i>	NS	NS	NS
<i>IL-10</i>	NS	NS	NS
<i>IL-12p40</i>	NS	NS	NS
<i>IL-17</i>	NS	NS	NS
Stress -related panel			
<i>BAG3</i>	<0.05	NS	NS
<i>CAT</i>	<0.05	NS	NS
<i>SOD</i>	<0.05	NS	NS
<i>HSP25</i>	NS	NS	NS
<i>HSP90</i>	NS	NS	NS
Chronic HS			
Immune-related panel			
<i>IL-2</i>	<0.05	NS	NS
<i>IL-4</i>	<0.001	<0.01	NS
<i>IL-6</i>	NS	NS	NS
<i>IL-10</i>	NS	NS	NS
<i>IL-12p40</i>	NS	<0.05	NS
<i>IL-17</i>	NS	NS	NS
Stress -related panel			
<i>BAG3</i>	NS	NS	NS
<i>CAT</i>	NS	NS	<0.01
<i>SOD</i>	NS	NS	<0.01
<i>HSP25</i>	NS	NS	NS
<i>HSP90</i>	NS	NS	NS

Effects: ¹ In ovo delivery of galactooligosaccharides (GOS) vs. physiological saline (C); ² ambient temperature (TN—thermoneutral vs. HS); ³ interaction between in ovo treatment and ambient temperature on immune-related and stress-response genes in chicken spleens. Gene expression analysis was done with RT-qPCR. The significance of effects that were calculated with two-way ANOVA. Significance levels: $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$ (significant), and $p > 0.05$ (non-significant, NS).

The results of the two-way ANOVA that was performed with the second statistical model (GOS vs. C; acute HS vs. chronic HS; GOS vs. C × acute HS vs. chronic HS) are presented in Table 4. In this

statistical model, we evaluated the effects of acute and chronic HS on the associated gene expression in the splenic tissue of slow-growing chickens. In ovo treatment had an effect on gene expression of *IL-4* ($p < 0.001$), which was consistent with the results obtained in the first statistical model. HS (acute vs. chronic) changed the gene expression of *IL-2* ($p < 0.05$) and *HSP90* ($p < 0.05$), which was not observed by comparing TN vs. HS (acute or chronic). The interaction of the two factors significantly affected the stress-related genes *CAT* and *SOD* ($p < 0.05$).

Table 4. Effects of in ovo treatment and the duration of heat stress (HS) on gene expression signatures in the spleens of slow-growing chickens.

Gene	Treatment ¹	HS ²	Treatment × HS ³
Immune-related panel			
<i>IL-2</i>	NS	<0.05	NS
<i>IL-4</i>	<0.001	NS	NS
<i>IL-6</i>	NS	NS	NS
<i>IL-10</i>	NS	NS	NS
<i>IL-12p40</i>	NS	NS	NS
<i>IL-17</i>	NS	NS	NS
Stress-related panel			
<i>BAG3</i>	NS	NS	NS
<i>CAT</i>	NS	NS	<0.05
<i>SOD</i>	NS	NS	<0.05
<i>HSP25</i>	NS	NS	NS
<i>HSP90</i>	NS	<0.05	NS

Effects: ¹ In ovo delivery of galactooligosaccharides (GOS) vs. physiological saline (C); ² HS (acute HS vs. chronic HS); ³ interaction between in ovo treatment and ambient temperature on immune-related and stress-response genes in chicken spleens. Gene expression analysis was done with RT-qPCR. The significance of effects was calculated with two-way ANOVA. Significance levels: $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$ (significant), and $p > 0.05$ (non-significant, NS).

3.2. Relative Gene Expression Changes in Heat Stress

Short-term (acute) heat (TN-C vs. HS-C) did not affect the gene expression signatures that are associated with immune and stress responses in slow-growing chickens. On the other hand, long-term (chronic) heat activated some immune-related and stress-related genes, presented in Figure 1. Chronic HS up-regulated anti-inflammatory (FC log₂ of *IL-10* = 1.88, $p < 0.05$) and pro-inflammatory cytokines (FC log₂ *IL-12p40* = 2.01, $p < 0.05$). Additionally, oxidative stress was activated in the spleen during chronic HS (FC log₂ *CAT* gene = 1.72, $p < 0.01$ and FC log₂ *SOD* gene = 1.55, $p < 0.05$). Surprisingly, the genes encoding chaperones (*HSP25* and *HSP90*) were not activated by either acute or chronic heat ($p > 0.05$).

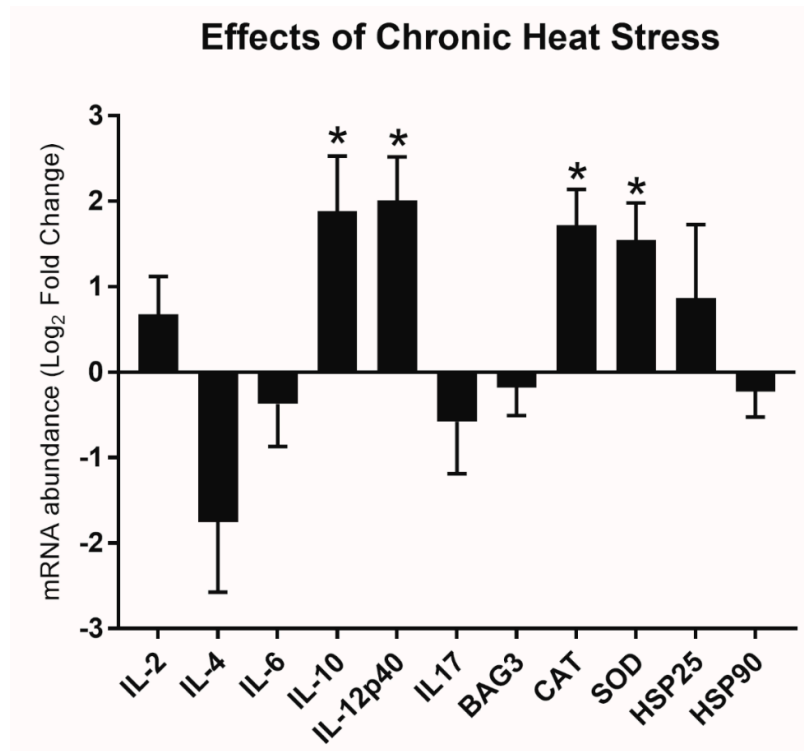


Figure 1. Relative messenger RNA (mRNA) expression of immune-related and stress-related genes in the spleens of slow-growing chickens that were challenged with chronic heat. Gene panel includes: interleukin: *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12p40*, and *IL-17* and stress-related genes: *CAT*, *SOD*, *BAG3*, *HSP25* and *HSP90*. The x-axis shows a list of genes. The y-axis indicate the relative mRNA abundance of the genes after heat challenge (n = 8). Gene expression analysis was carried out with RT-qPCR. qPCR reactions were performed in triplicate. The geometric mean of the *ACTB* and *UB* reference genes was used to calculate delta cycle threshold (dCt) values. The relative gene expression (FC – fold change) was calculated with the delta delta cycle threshold (ddCt) formula and the fold change (FC) was calculated as follows: $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. FC values were transformed and presented as Log_2FC . The standard error of the means (SEM) shows distribution of the Ct values. Normalized data (dCt values) of thermoneutral control (mock-injected) and heat-stressed control (mock-injected) groups were compared with a Student's t-test. Significant differences ($p < 0.05$) are labelled with an asterisk (*). Figures were prepared by using GraphPad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3.3. Effects of GOS Delivered in ovo on Gene Expression Modulation during Acute and Chronic Heat Stress

Figure 2 presents effects of GOS that were delivered in ovo on gene expression signatures during HS. Overall, GOS that were delivered in ovo decreased the splenic expression of the immune-related and stress-related genes during HS (HS-GOS). The most striking effects of GOS that were delivered in ovo on the immune-related gene expression signatures was the down-regulation of *IL-4* cytokine during acute ($FC \log_2 IL-4 = -6.10, p < 0.01$) and chronic ($FC \log_2 IL-4 = -3.45, p < 0.01$) HS. Furthermore, GOS that were delivered in ovo decreased the expression of pro-inflammatory cytokine, *IL-12p40*, during chronic heat ($FC \log_2 IL-12p40 = -1.13, p < 0.05$). Finally, in ovo treatment reduced oxidative stress induced by chronic heat ($FC \log_2 CAT = -1.72, p < 0.05$ and $SOD = -1.56, p < 0.05$). GOS that were delivered in ovo did not modulate expression of the chaperones ($p > 0.05$).

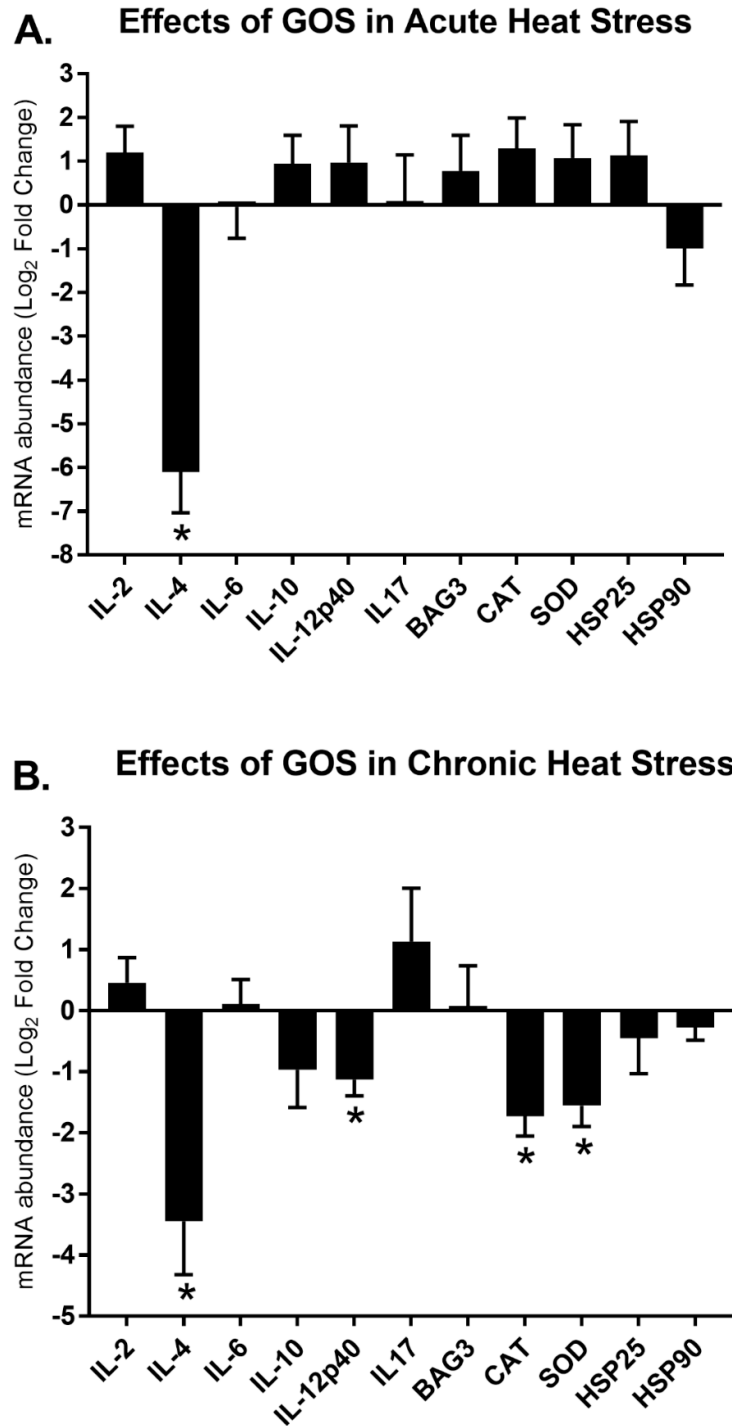


Figure 2. Relative mRNA expression of immune-related and stress-related genes in the spleens of slow-growing chickens injected in ovo with GOS and challenged with heat on two levels: **A**—acute (30° C for 8.5 h); and **B**—chronic (30° C for 14 days). Gene panel includes: interleukin: *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12p40*, *IL-17* and stress-related genes: *CAT*, *SOD*, *BAG3*, *HSP25* and *HSP90*. X-axis shows a list of genes. Y-axis indicate relative mRNA abundance of the genes after heat challenge (n = 8). Gene expression analysis was carried out with RT-qPCR. qPCR reactions were performed in triplicates. Geometric mean of *ACTB* and *UB* reference genes was used to calculate dCt values. The relative gene expression was calculated with $ddCt$ formula ($FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). FC values were transformed and presented as Log_2FC . Standard error of the means (SEM) shows distribution of the Ct values. Normalized data (dCt values) of heat-challenged (A-acute, B-chronic) control (mock-injected) and heat-stressed GOS

treatment groups were compared with Student's t-test. Significant differences ($p < 0.05$) were labelled with an asterisk (*). Figures were prepared by using GraphPad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

4. Discussion

4.1. Immune-related Gene Expression Signatures

In this study, we determined impact of two factors (i.e., the GOS that were delivered in ovo and HS) on immune-related and stress-related gene expression signatures in the spleens of slow-growing chickens. The spleen is the largest peripheral lymphoid organ and plays a key role in immune responses in chickens [50]. Gene expression signatures that were determined in the splenic tissue informed about the systemic immune response to challenging factors, including heat [51]. The GIT is highly responsive to heat. The detrimental effects of HS on intestinal homeostasis include a reduced nutrient absorption, a disrupted integrity of the intestinal wall, and an activated immune system [52,53]. Intestinal epithelial cells are connected with gap junctions, tight junctions, adherent junctions, and desmosomes [54]. Under the influence of high temperature, the barrier function is compromised, and the intestinal lumen content enters the bloodstream, causing chronic systemic inflammation [25]. The activation of Toll-like receptors (TLR) by microbial signatures triggers myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), which in turn induces cytokine secretion [55].

Cytokines are intracellular peptides that serve as immune mediators. During HS, the levels of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines increase. This is due to endotoxemia, which is a storm of microbial endotoxin (i.e., LPS—lipopolysaccharides) infiltrating the milieu of the body [56]. In the current study, slow-growing chickens that were subjected to chronic HS demonstrated a significantly higher expression of *IL-10* and *IL-12p40*. *IL-10* skews immune responses towards Th2-type (humoral) responses, while *IL-12p40* is associated with Th1-type (cellular) immune responses [57]. There is a strong interaction between these cytokines. *IL-10* causes a negative regulation of the Th1 response [58]. In this paper, chronic (but not acute) HS increased the level of splenic mRNA encoding both *IL-10* and *IL-12p40*. There are two hypotheses of such the counter-balancing expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in the spleens of heat-stressed chickens. First, the *IL-10* and *IL-12p40* cytokine expression in the spleen can be mediated by the TLR2 signaling pathway, triggered by Gram-positive cell wall components [59]. In heat-stressed individuals, those Gram-positive cell wall components originate from intestinal content, which leaks into the milieu of the body due to increased intestinal permeability [56]. Different bacterial ligands can stimulate TLR2 receptors on different antigen presenting cells (e.g., lymphocyte B, dendritic cells, or macrophages) in the spleen [60]. The gastrointestinal origin of those TLR ligands suggests their variability, and, as such, the ability to activate TLR signaling pathways in different cells. The second hypothesis is associated with endotoxemia that is mediated by LPS influx from the gut due to HS (as mentioned above). Endotoxemia triggers strong pro-inflammatory responses (mediated by *IL-12p40*) that are balanced by anti-inflammatory *IL-10* cytokine [61]. In summary, the activation of two major cytokines in the spleens of slow-growing chickens indicates that the individuals responded to heat with increased pro- and anti-inflammatory immune responses.

GOS that were delivered in ovo balanced the level of *IL-10* and *IL-12p40* to the baseline (under acute HS) or even down-regulated cytokine expression (under chronic HS). Previously, we have determined that GOS that were delivered in ovo increased the expression of the genes that are involved in the barrier function of the gut of broiler chickens [32]. An improved barrier function allows for a decrease of intestinal permeability due to stress and the influx of antigens into the milieu of the body [62]. In the absence of an antigenic cocktail, TLR-mediated immune responses are not activated. In a broiler study that was conducted with the same experimental design as the current study, *IL-12p40* was up-regulated by acute HS, but in ovo GOS stimulation decreased its expression to the level of the control groups [41]. It can be concluded that heat induced mild immune responses in slow-growing chickens, but GOS that were delivered in ovo managed to dampen immune responses under HS.

Interleukin 4 (*IL-4*) was one of the cytokines that was modulated in slow-growing chickens by both environmental factors, i.e., GOS that were delivered in ovo and HS. Individuals that were treated with GOS under acute and chronic HS expressed a decreased mRNA level of the *IL-4* cytokine, confirmed by a significant interaction between the two factors. In our earlier study on broilers [41], the mRNA level of *IL-4* was elevated by acute HS (similarly as *IL-12p40*), but in ovo stimulation with GOS dampened its level to the baseline (i.e., mock-injected controls). In the current study on slow-growing chickens, *IL-4* was numerically down-regulated by HS alone, and the down-regulation was further enhanced by the in ovo delivery of GOS (the interaction between treatment and temperature was significant). *IL-4* cytokine acts in humoral immunity as a pleiotropic cytokine that is produced in response to receptor activation by Th2-type T cells, basophils, and mast cells [63]. Its major function is regulating antigen-stimulated naïve T cell differentiation and the expression of the specific immunoglobulin E (IgE) and immunoglobulin G (IgG) by B cells [64]. Quinteiro-Filho et al. (2017) found that chronic HS decreased the plasma levels of Immunoglobulin A (IgA) and IgG in broiler chickens [65]. It seems that splenic *IL-4* is a good biomarker of the HS response in different chicken genotypes. Early GOS delivery dampens heat-induced Th2 immune responses in slow-growing chickens.

4.2. Stress-related Gene Expression Signatures

Exposure to HS can lead to oxidative stress, which is characterized by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the cells. The first line of defense is the production of cellular antioxidant enzymes including CAT and SOD, which protect the cells from ROS-induced cellular damage [66]. The current study showed a significant increase in the mRNA expression of *CAT* and *SOD* genes during chronic HS. Such increase indicates the activation of the pathways that are associated with counteracting the effects of oxidative stress. HS has been reported to increase the hepatic activity of *CAT* and *SOD* enzymes in two broiler chicken genotypes (Ross 308 and Cobb 500) (<http://en.aviagen.com/brands/ross/products/ross-308>) [67]. Habashy et al. (2018) reported the up-regulation of the mRNA level of *SOD* (but not *CAT*) gene under chronic HS (12 days) [68]. Low/basic levels of oxidative stress can play an important role in adapting to stressful environmental conditions [69]. In poultry, antioxidants use ROS to activate the expression of vitagenes, which are responsible for biological adaptation to stress. Vitagenes include the *SOD* and *HSP* genes.

In slow-growing chickens, only chronic HS triggered mRNA responses. Long-term HS (14 days) activated anti-inflammatory (*IL-10*), pro-inflammatory (*IL-12p40*), and oxidative stress responses (*CAT* and *SOD*). Long-term HS can lead to chronic systemic oxidative stress, which is associated with mild subclinical inflammation. This condition, called “OxInflammation,” impairs natural homeostatic adaptation, which leads to stronger systemic inflammation and an increased susceptibility to diseases [70]. If it is not possible to eliminate stressors from the environment, OxInflammation can be reduced by improved acclimatization (e.g., by stimulating intestinal microbiota) and adaptation (e.g., by using slow-growing hybrids).

In this study, both *CAT* and *SOD* were up-regulated by chronic (but not acute) HS, but in ovo delivered GOS dampened the mRNA expression of both genes. GOS-stimulated chickens expressed down-regulated signatures of oxidative stress compared to mock-injected birds. Oxidative stress has been recently linked with intestinal microbiota [71]. Apparently, direct contact between intestinal epithelial cells and microbiota induces the production of physiological ROS [72]. Different species of intestinal microbiota induce different levels of ROS production in the gut. For example, *Lactobacillus* has been reported to trigger ROS production both in vitro and in vivo [72]. We previously determined that GOS that were delivered in ovo elicited bifidogenic effects in broiler chickens (i.e., a higher level of *Bifidobacteria*), which resulted in a decreased *Lactobacilli* level in the caecum [32]. We can speculate that GOS that were delivered in ovo had a potent effect on intestinal microbiota composition, which led to a decreased intestinal ROS production under chronic HS.

Splenic *HSP* genes in slow-growing chickens did not respond to HS, neither acute nor chronic. The up-regulation of *HSP* is a cellular reaction to reduce the risk of damage (by protein misfolding) during stress. In our earlier study, we observed that the mRNA expression of *HSP* was triggered in

broiler chickens by acute HS, which did not cause any molecular responses in slow-growing chickens (data not presented). This suggests that slow-growing chickens are heat-tolerant, and the mild elevated ambient temperature (30 °C) did not activate HS response via chaperone proteins [73]. Comparative studies on two Brazilians native chicken breeds and commercial line Cobb chickens have shown that *HSP70* and *HSP90* gene expression differs significantly between breeds. *HSP* genes were highly up-regulated in native breeds only at a very high ambient temperature (39 °C), which proved them resistant to high temperatures [18].

On a performance level, HS causes losses in feed intake and growth rate. In broiler chickens, chronic HS has been found to significantly reduce ($p < 0.01$) final body weight (BW) (2.52 kg in TN vs. 3.11 kg in HS) [32,39,40]. In the current study, chronic HS also reduced final BW ($p < 0.001$), but the difference between TN and HS was almost two times lower than in broiler chickens (2.21 kg in TN vs. 1.94 kg in HS), even with the longer rearing period (42 days in broilers vs. 50 days in slow-growing chickens). The slow-growing crossbreds, which were analyzed in this study, are considered by the Hubbard breeding company as “exceptional in their rusticity.” This indicates better hardiness in comparison to highly selected and fast-growing broilers. The results presented in this paper confirm that slow-growing crossbreds lost only 12% of their total BW due to HS, whereas the losses in fast-growing broilers amounted to 24% of their total BW. GOS that were delivered in ovo improved ($p < 0.01$) the final BW in broiler chickens (2.76 kg in control chickens vs. 2.89 kg in GOS). In the current study, the final BW of slow-growing chickens was not improved ($p > 0.05$) by GOS that were delivered in ovo (2.04 kg in control chickens vs. 2.00 kg in GOS) (Federico Sirri, personal communication). The differences in growth rate seemed to have had an impact on the responses to HS in chickens. However, at this point, the data on slow-growing chickens are limited. Therefore, we find it difficult to provide an explanation for why this genotype reacted differently than the highly selected, fast-growing broilers.

5. Conclusions

Slow-growing chickens proved to be well adapted to acute HS, which did not trigger immune-related or stress-related gene expression in the spleen. On the other hand, chronic HS activated genes that are associated with inflammation and oxidative stress (i.e., OxInflammation). GOS that were delivered in ovo mitigated heat-induced OxInflammation and decreased Th2 responses (down-regulation of *IL-4*). We demonstrated that the genetic adaptation of slow-growing chickens to HS combined with in ovo stimulation with GOS has mitigating effects on the molecular pathways that are associated with immune and stress responses.

Author Contributions: conceptualization, A.S.; methodology, F.S., M.Z., G.M., A.D. and A.S.; formal analysis, E.P.; investigation, M.Z., F.S., E.P. and A.S.; resources, A.M., F.S., S.T. and A.S.; data curation, E.P., A.D., M.S. and A.S.; writing—original draft preparation, E.P. and A.D.; writing—review and editing, E.P., M.S. and A.S.; visualization, A.S.; supervision, F.S., A.M., G.M. and A.S.; project administration, S.T. and G.M.; funding acquisition, G.M. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by OVOBIOTIC project (grant# RBSI14WZCL) from Ministry of Education, Universities and Research (MIUR) in Rome, Italy and supported by the Polish National Agency for Academic Exchange under Grant No. PPI/APM/2019/1/00003. Aleksandra Skiba and Marika Weitz are kindly acknowledged for their excellent technical assistance with RNA extraction.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Roushdy, E.M.; Zagloul, A.W.; El-Tarabany, M.S. Effects of chronic thermal stress on growth performance, carcass traits, antioxidant indices and the expression of *HSP70*, growth hormone and superoxide dismutase genes in two broiler strains. *J. Therm. Biol.* **2018**, *74*, 337–343.
2. Suk, Y.O.; Washburn, K.W. Effects of environment on growth, efficiency of feed utilization, carcass fatness,

- and their association. *Poult. Sci.* **1995**, *74*, 285–296.
3. Reay, D.; Reay, D. Climate-Smart Chicken. In *Climate-Smart Food*; Springer International Publishing: New York City, NY, USA, 2019; pp. 107–120.
 4. Lara, L.J.; Rostagno, M.H. Impact of heat stress on poultry production. *Animals* **2013**, *3*, 356–369.
 5. Washburn, K.W.; Peavey, R.; Renwick, G.M. Relationship of strain variation and feed restriction to variation in blood pressure and response to heat stress. *Poult. Sci.* **1980**, *59*, 2586–2588.
 6. Tallentire, C.W.; Leinonen, I.; Kyriazakis, I. Breeding for efficiency in the broiler chicken: A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*.
 7. Sohail, M.U.; Hume, M.E.; Byrd, J.A.; Nisbet, D.J.; Ijaz, A.; Sohail, A.; Shabbir, M.Z.; Rehman, H. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 2235–2240.
 8. Niu, Z.Y.; Liu, F.Z.; Yan, Q.L.; Li, W.C. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poult. Sci.* **2009**, *88*, 2101–2107.
 9. Deeb, N.; Cahaner, A. Genotype-by-environment interaction with broiler genotypes differing in growth rate. 3. Growth rate and water consumption of broiler progeny from weight-selected versus nonselected parents under normal and high ambient temperatures. *Poult. Sci.* **2002**, *81*, 293–301.
 10. Tavaniello, S.; Slawinska, A.; Prioriello, D.; Petrecca, V.; Bertocchi, M.; Zampiga, M.; Salvatori, G.; Maiorano, G. Effect of galactooligosaccharides delivered in ovo on meat quality traits of broiler chickens exposed to heat stress. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 612–619.
 11. Shi, D.; Bai, L.; Qu, Q.; Zhou, S.; Yang, M.; Guo, S.; Li, Q.; Liu, C. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 2405–2413.
 12. Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 1369–1378.
 13. Nienabar, J.A.; Hahn, G.L.; Nienaber, J.A. Livestock production system management responses to thermal challenges. **2007**, 149–157.
 14. Nyoni, N.M.B.; Grab, S.; Archer, E.R.M. Heat stress and chickens: climate risk effects on rural poultry farming in low-income countries. *Clim. Dev.* **2019**, *11*, 83–90.
 15. Stocker, T.F.; Qin, D.; Plattner, G.K.; Tignor, M.; Allen, S.K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V.; Midgley, P.M. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Cambridge, England, 2013, 1535.
 16. Taylor, N.A.S. Human heat adaptation. *Compr. Physiol.* **2014**, *4*, 325–365.
 17. Song, J.; Xiao, K.; Ke, Y.L.; Jiao, L.F.; Hu, C.H.; Diao, Q.Y.; Shi, B.; Zou, X.T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 581–588.
 18. Cedraz, H.; Gromboni, J.G.G.; Garcia, A.A.P.; Farias Filho, R.V.; Souza, T.M.; De Oliveira, E.R.; De Oliveira, E.B.; Do Nascimento, C.S.; Meneghetti, C.; Wenceslau, A.A. Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. *PLoS One* **2017**, *12*, e0186083.
 19. Duangjinda, M.; Tunim, S.; Duangdaen, C.; Boonkum, W. Hsp70 genotypes and heat tolerance of commercial and native chickens reared in hot and humid conditions. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* **2017**, *19*, 7–18.
 20. Horst, P. Native fowl as reservoir for genomes and major genes with direct and indirect effects on the adaptability and their potential for tropically oriented breeding plans. *Arch. Anim. Breed* **1989**, *53*, 93–101.
 21. Galal, A.; Radwan, L.M.; Rezik, H.H.; Ayoub, H. Expression levels of HSP70 and CPT-1 in three local breeds of chickens reared under normal or heat stress conditions after the introduction of the naked neck gene. *J. Therm. Biol.* **2019**, *80*, 113–118.
 22. Aengwanich, W. Comparative ability to tolerate heat between Thai indigenous chickens, Thai indigenous chickens crossbred and broilers by using heterophil/lymphocyte ratio. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2007**, *10*, 1840–1844.
 23. Suzuki, K.; Harasawa, R.; Yoshitake, Y.; Mitsuoka, T. Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks. *Nippon juigaku zasshi. Japanese J. Vet. Sci.* **1983**, *45*, 331–338.
 24. He, J.; He, Y.; Pan, D.; Cao, J.; Sun, Y.; Zeng, X. Associations of gut microbiota with heat stress-induced changes of growth, fat deposition, intestinal morphology, and antioxidant capacity in ducks. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
 25. Tellez Jr., G.; Tellez-Isaias, G.; Dridi, S. Heat Stress and Gut Health in Broilers: Role of Tight Junction

- Proteins. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci. - Open J.* **2017**, *3*, e1–e4.
26. Wang, W.C.; Yan, F.F.; Hu, J.Y.; Amen, O.A.; Cheng, H.W. Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 1654–1666.
 27. Sohail, M.U.; Ijaz, A.; Yousaf, M.S.; Ashraf, K.; Zaneb, H.; Aleem, M.; Rehman, H. Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and lactobacillus-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 1934–1938.
 28. Zulkifli, I.; Abdullah, N.; Mohd. Azrin, N.; Ho, Y.W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Br. Poult. Sci.* **2000**, *41*, 593–597.
 29. Baurhoo, B.; Phillip, L.; Ruiz-Feria, C.A. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 1070–1078.
 30. Ohland, C.L.; MacNaughton, W.K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **2010**, *298*.
 31. Siwek, M.; Slawinska, A.; Stadnicka, K.; Bogucka, J.; Dunislawska, A.; Bednarczyk, M. Prebiotics and synbiotics - In ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*.
 32. Slawinska, A.; Dunislawska, A.; Płowiec, A.; Radomska, M.; Lachmanska, J.; Siwek, M.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLoS One* **2019**, *14*.
 33. Dunislawska, A.; Slawinska, A.; Stadnicka, K.; Bednarczyk, M.; Gulewicz, P.; Jozefiak, D.; Siwek, M. Synbiotics for Broiler Chickens—In Vitro Design and Evaluation of the Influence on Host and Selected Microbiota Populations following In Ovo Delivery. *PLoS One* **2017**, *12*, e0168587.
 34. Bednarczyk, M.; Stadnicka, K.; Kozłowska, I.; Abiuso, C.; Tavaniello, S.; Dankowiakowska, A.; Sławińska, A.; Maiorano, G. Influence of different prebiotics and mode of their administration on broiler chicken performance. *Animal* **2016**, *10*, 1271–1279.
 35. Sławińska, A.; Siwek, M.; Zylinska, J.; Bardowski, J.; Brzezinska, J.; Gulewicz, K.A.; Nowak, M.; Urbanowski, M.; Płowiec, A.; Bednarczyk, M. Influence of synbiotics delivered in ovo on immune organs development and structure. *Folia Biol.* **2014**, *62*, 277–285.
 36. Stefaniak, T.; Madej, J.P.; Graczyk, S.; Siwek, M.; Łukaszewicz, E.; Kowalczyk, A.; Sieńczyk, M.; Bednarczyk, M. Selected prebiotics and synbiotics administered in ovo can modify innate immunity in chicken broilers. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 105.
 37. Bogucka, J.; Dankowiakowska, A.; Elminowska-Wenda, G.; Sobolewska, A.; Szczerba, A.; Bednarczyk, M. Effects of prebiotics and synbiotics delivered in ovo on broiler small intestine histomorphology during the first days after hatching. *Folia Biol.* **2016**, *64*, 131–143.
 38. Hughes, R.A.; Ali, R.A.; Mendoza, M.A.; Hassan, H.M.; Koci, M.D. Impact of dietary galactooligosaccharide (GOS) on chicken's gut microbiota, mucosal gene expression, and *Salmonella* colonization. *Front. Vet. Sci.* **2017**, *4*.
 39. Slawinska, A.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Bertocchi, M.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Impact of galactooligosaccharides delivered in ovo on mitigating negative effects of heat stress on performance and welfare of broilers. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 407–415.
 40. Slawinska, A.; Płowiec, A.; Siwek, M.; Jaroszewski, M.; Bednarczyk, M. Long-Term Transcriptomic Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered In Ovo in Broiler Chickens. *PLoS One* **2016**, *11*, e0168899.
 41. Slawinska, A.; Mendes, S.; Dunislawska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Avian model to mitigate gut-derived immune response and oxidative stress during heat. *Biosystems.* **2019**, *178*, 10–15.
 42. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
 43. Sławińska, A.; Siwek, M.Z.; Bednarczyk, M.F. Effects of synbiotics injected in ovo on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am. J. Vet. Res.* **2014**, *75*, 997–1003.
 44. Chiang, H.I.; Berghman, L.R.; Zhou, H. Inhibition of NF- κ B 1 (NF- κ Bp50) by RNA interference in chicken macrophage HD11 cell line challenged with *Salmonella enteritidis*. *Genet. Mol. Biol.* **2009**, *32*, 507–515.
 45. Rothwell, L.; Young, J.R.; Zoorob, R.; Whittaker, C.A.; Hesketh, P.; Archer, A.; Smith, A.L.; Kaiser, P.

- Cloning and Characterization of Chicken IL-10 and Its Role in the Immune Response to *Eimeria maxima*. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 2675–2682.
46. Brisbin, J.T.; Gong, J.; Parvizi, P.; Sharif, S. Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clin. Vaccine Immunol.* **2010**, *17*, 1337–1343.
 47. Wang, S.H.; Cheng, C.Y.; Tang, P.C.; Chen, C.F.; Chen, H.H.; Lee, Y.P.; Huang, S.Y. Differential gene expressions in testes of L2 strain Taiwan country chicken in response to acute heat stress. *Theriogenology* **2013**, *79*.
 48. El-Deep, M.H.; Ijiri, D.; Eid, Y.Z.; Yamanaka, H.; Ohtsuka, A. Effects of dietary supplementation with *Aspergillus Awamorion* growth performance and antioxidative status of broiler chickens exposed to high ambient temperature. *Egypt. J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.* **2014**, *51*, 281–288.
 49. De Boever, S.; Vangestel, C.; De Backer, P.; Croubels, S.; Sys, S.U. Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2008**, *122*, 312–317.
 50. Zhang, Q.; Waqas, Y.; Yang, P.; Sun, X.; Liu, Y.; Ahmed, N.; Chen, B.; Li, Q.; Hu, L.; Huang, Y.; et al. Cytological study on the regulation of lymphocyte homing in the chicken spleen during LPS stimulation. *Oncotarget* **2017**, *8*, 7405–7419.
 51. Ohtsu, H.; Yamazaki, M.; Abe, H.; Murakami, H.; Toyomizu, M. Heat Stress Modulates Cytokine Gene Expression in the Spleen of Broiler Chickens. *J. Poult. Sci.* **2015**, *52*, 282–287.
 52. Liu, F.; Yin, J.; Du, M.; Yan, P.; Xu, J.; Zhu, X.; Yu, J. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling1. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 1941–1949.
 53. Varasteh, S.; Braber, S.; Akbari, P.; Garssen, J.; Fink-Gremmels, J. Differences in Susceptibility to Heat Stress along the Chicken Intestine and the Protective Effects of Galacto-Oligosaccharides. *PLoS One* **2015**, *10*, e0138975.
 54. Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 631–659.
 55. Karnati, H.K.; Pasupuleti, S.R.; Kandi, R.; Undi, R.B.; Sahu, I.; Kannaki, T.R.; Subbiah, M.; Gutti, R.K. TLR-4 signalling pathway: MyD88 independent pathway up-regulation in chicken breeds upon LPS treatment. *Vet. Res. Commun.* **2015**, *39*, 73–78.
 56. Heled, Y.; Fleischmann, C.; Epstein, Y. Cytokines and their role in hyperthermia and heat stroke. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2013**, *24*, 85–96.
 57. Heufler, C.; Koch, F.; Stanzl, U.; Topar, G.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; Enk, A.; Steinman, R.M.; Romani, N.; Schuler, G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 659–668.
 58. Ma, X.; Yan, W.; Zheng, H.; Du, Q.; Zhang, L.; Ban, Y.; Li, N.; Wei, F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research* **2015**, *4*, 1–13.
 59. Chau, T.A.; McCully, M.L.; Brintnell, W.; An, G.; Kasper, K.J.; Vinés, E.D.; Kubes, P.; Haeryfar, S.M.M.; McCormick, J.K.; Cairns, E.; et al. Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 641–648.
 60. Duell, B.L.; Tan, C.K.; Carey, A.J.; Wu, F.; Cripps, A.W.; Ulett, G.C. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *64*, 295–313.
 61. Waal Malefyt, R. De; Haanen, J.; Spits, H.; Koncarolo, M.G.; Te Velde, A.; Figdor, C.; Johnson, K.; Kastelein, R.; Yssel, H.; De Vries, J.E. Interleukin 10 (il-10) and viral il-10 strongly reduce antigen-specific human t cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* **1991**, *174*, 915–924.
 62. Vancamelbeke, M.; Vermeire, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *11*, 821–834.
 63. Silva-Filho, J.L.; Caruso-Neves, C.; Pinheiro, A.A.S. IL-4: An important cytokine in determining the fate of T cells. *Biophys. Rev.* **2014**, *6*, 111–118.
 64. Keegan, A.D. Interleukin 4 Receptor. In *Encyclopedia of Immunology*; Elsevier, 1998; pp. 1453–1455.
 65. Quinteiro-Filho, W.M.; Calefi, A.S.; Cruz, D.S.G.; Aloia, T.P.A.; Zager, A.; Astolfi-Ferreira, C.S.; Piantino Ferreira, J.A.; Sharif, S.; Palermo-Neto, J. Heat stress decreases expression of the cytokines, avian β -defensins 4 and 6 and Toll-like receptor 2 in broiler chickens infected with *Salmonella Enteritidis*. *Vet.*

- Immunol. Immunopathol.* **2017**, *186*, 19–28.
66. Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 231–255.
 67. Abdo, S.E.; El-Kassas, S.; El-Nahas, A.F.; Mahmoud, S. Modulatory Effect of Monochromatic Blue Light on Heat Stress Response in Commercial Broilers. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*.
 68. Habashy, W.S.; Milfort, M.C.; Rekaya, R.; Aggrey, S.E. Expression of genes that encode cellular oxidant/antioxidant systems are affected by heat stress. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 389–394.
 69. Yan, L.J. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 165–169.
 70. Valacchi, G.; Virgili, F.; Cervellati, C.; Pecorelli, A. OxInflammation: From subclinical condition to pathological biomarker. *Front. Physiol.* **2018**, *9*.
 71. Jones, R.M.; Mercante, J.W.; Neish, A.S. Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1519–29.
 72. Kumar, A.; Wu, H.; Collier-Hyams, L.S.; Hansen, J.M.; Li, T.; Yamoah, K.; Pan, Z.Q.; Jones, D.P.; Neish, A.S. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4457–4466.
 73. Kaźmierczuk, A.; Kiliańska, Z.M. The pleiotropic activity of heat-shock proteins. *Postep. Hig Med Dosw* **2009**, *63*, 502–521, (in Polish).



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides

Elzbieta Pietrzak ¹, Jan Mazurkiewicz ² and Anna Slawinska ^{1,*}

¹ Department of Animal Biotechnology and Genetics, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland; elzbieta.pietrzak@utp.edu.pl

² Division of Inland Fisheries and Aquaculture, Institute of Zoology Wojska Polskiego 71c, Poznan University of Life Sciences, 60-625 Poznań, Poland; jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl

* Correspondence: slawinska@utp.edu.pl; Tel.: +48-052-374-97-50

Received: 5 February 2020; Accepted: 3 March 2020; Published: 5 March 2020



Simple Summary: The skin mucosa in fish is equipped with innate immune mechanisms, which constitute the first line of defense against potentially harmful factors in the aquatic environment. Prebiotics, such as galactooligosaccharides (GOS), mediate modulation of the immune responses. Dietary prebiotics promote the development of intestinal microbiota, which interacts with the immune system. In this study, we analyzed the effects of the GOS prebiotic applied as a feed additive on molecular responses in the skin mucosa of the common carp. The genes analyzed encode various proteins associated with the innate immune response in skin mucosa in fish, such as mucin secretion, antimicrobial peptides, and enzymes. Modulated expression of those genes at the mRNA level regulates the defense mechanisms in the skin mucosa. In this study, supplementation with GOS increased the mRNA level of interferon and lysozyme, which are involved in fighting infection. At the same time, GOS decreased the mRNA level of CRP, which is a marker of inflammation. We conclude that supplementation with GOS modulates innate immune processes in the skin mucosa of common carp. Further studies could be focused on analyzing the effects of GOS on the microbiota composition of the skin mucosa and the mitigating effects against environmental stress.

Abstract: Galactooligosaccharides (GOS) are well-known immunomodulatory prebiotics. We hypothesize that GOS supplemented in feed modulates innate immune responses in the skin-associated lymphoid tissue (SALT) of common carp. The aim of this study was to determine the impact of GOS on mRNA expression of the immune-related genes in skin mucosa. During the feeding trial, the juvenile fish (bodyweight 180 ± 5 g) were fed two types of diet for 50 days: control and supplemented with 2% GOS. At the end of the trial, a subset of fish was euthanized ($n = 8$). Skin mucosa was collected, and RNA was extracted. Gene expression analysis was performed with RT-qPCR to determine the mRNA abundance of the genes associated with innate immune responses in SALT, i.e., acute-phase protein (CRP), antimicrobial proteins (*His2Av* and *GGGT5L*), cytokines (*IL1 β* , *IL4*, *IL8*, *IL10*, and *IFN γ*), lectin (*CLEC4M*), lysozymes (*LyzC* and *LyzG*), mucin (*M5ACL*), peroxidase (*MPO*), proteases (*CTSB* and *CTSD*), and oxidoreductase (*TXNL*). The geometric mean of *40s s11* and *ACTB* was used to normalize the data. Relative quantification of the gene expression was calculated with $\Delta\Delta Ct$. GOS upregulated *INF γ* ($p \leq 0.05$) and *LyzG* ($p \leq 0.05$), and downregulated *CRP* ($p \leq 0.01$). We conclude that GOS modulates innate immune responses in the skin mucosa of common carp.

Keywords: fish; GOS; prebiotic; mucosal immunity; reference genes; skin-associated lymphoid tissue

1. Introduction

The aquatic environment constantly challenges the water fauna with microbiological, physical, and chemical stressors (e.g., bacteria, viruses, parasites, osmotic pressure, and physical obstacles). Skin serves as the first line of defense against microorganisms and other stressors, and it is, therefore, considered a major immune organ in fish [1]. Fish skin consists of the dermis and a layer of the mucus-secreting epidermis (known as skin mucosa), covered with calcified scales [2]. The skin mucosa has high metabolic activity and unique morphology [3]. Fish skin has developed distinct mechanisms of mucosal immunity. First, it is covered by mucus that prevents pathogens from sticking to the skin surface. Second, it contains a large variety of antibacterial compounds, including proteins and enzymes, such as lysozyme and proteolytic enzymes, immunoglobulins, complement proteins, lectins, and C-reactive proteins [4,5]. Third, the dermis and epidermis contain a number of immunocompetent cells, including epithelial, mucus, club, and goblet cells, that account for the skin-associated lymphoid tissue (SALT) [6,7]. The major function of SALT is to locally recognize antigens in the skin and neutralize them with various types of innate and specific mechanisms [8]. Immunoglobulin T (IgT) plays a significant role in the immune responses mounted by SALT, which directly resembles the mechanisms of the intestinal mucosal immunity [9].

An important adaptation of the skin mucosa to the aquatic environment is the microbiota inhabiting the mucus. Skin microbiota consists mostly of the commensal bacteria, with a population of about 10^2 – 10^4 bacteria per cm^2 of the skin [10]. Most fishes are oviparous, which means that from the moment of hatching, they are exposed to the microorganisms inhabiting water reservoirs. For this reason, a rich skin microbiota enhances the fish's protection against environmental pathogens [11]. The known mechanisms in which skin microbiota prevents colonization of the pathogens are competitive exclusion and secretion of antimicrobial compounds [12,13]. The structure of the microbial community in the skin microbiota reflects the surrounding environment and is characterized by large interspecies diversity [14,15]. For example, 16S rRNA analysis of intestinal samples from several fish species revealed that the most abundant order in freshwater fish is *Aeromonadales*, whereas in saltwater—*Vibrionales*. It shows the influence of a single factor, which is the level of the water salinity, on the microbiota composition. The trophic level also has an effect on the microbiota; the microbiota of herbivorous fishes (including common carp) typically resemble the microbiota of mammals [16]. Pyrosequencing of 16S rRNA revealed that the gastrointestinal microbiota of common carp contains *Fusobacteria* (46%), *Bacteroidetes* (21%), *Planctomycetes* (12%), *Gammaproteobacteria* (7%), as well as *Clostridia* (3%), *Verrucomicrobiae* (1%), and *Bacilli* (1%) [17].

The gastrointestinal microbiota can be modulated by prebiotics supplemented in feed. The most commonly used prebiotics in aquaculture include inulin, beta-glucan, fructooligosaccharides (FOS), mannanoligosaccharides (MOS), galactooligosaccharides (GOS), xylooligosaccharides (XOS), arabinoxyloligosaccharides (AXOS), and isomaltooligosaccharides (IMO) [18]. The use of a prebiotic or synbiotic (prebiotic + probiotic) in the fish's diet improves growth parameters [19,20], stimulates digestive enzymes [21], increases resistance to bacterial and viral diseases [22], improves hematological parameters [23], modulates composition of the intestinal microbiota, enhances intestinal microvilli and absorption surface [19,24–26], and also affects the level of the immune-related gene expression [27].

Modulating the innate immune responses in fish by feed additives can support health and prevent diseases [19]. Various feed additives with immunostimulatory effects have been studied, such as herbs, prebiotics, probiotics, and synbiotics [20,28–30]. The mucus layers of the fish skin are rich in ingredients associated with the innate immune system, such as immunoglobulins, complement proteins, c-reactive proteins, lysozymes, proteases, and antimicrobial peptides [31]. The aim of the study was to analyze the effects of GOS prebiotic applied as a feed additive on the mRNA expression of the genes associated with the innate immune responses in the skin mucosa of the common carp (*Cyprinus carpio*).

2. Materials and Methods

2.1. Fish, Feeds, and Experimental Design

The experiment was conducted at the Experimental Station of Feed Production Technology and Aquaculture (affiliated with Poznań University of Life Sciences) in Muchocin (Poland). Three hundred one-year-old fish of the common carp (*Cyprinus carpio*), with a mean bodyweight of 180 g (± 5 g), were placed in 12 concrete tanks (60 m³). The distribution of the fish was 25 individuals per tank. The tanks were individually supplied with water from the Struga Dormowska river, in an open system with a mechanical prefiltration chamber. Construction of the tanks allowed the maintenance of the maximum water level with constant water flow. Each tank was equipped with an automatic belt feeder allowing permanent access to the feed for 12 h a day.

The daily diet ration was calculated based on the carp feeding key developed by Miyatake [32]. Water temperature and the current fish weight was accounted for. The dietary formulation and proximate composition of the feeds are shown in Table 1. The feeds were processed using a single-screw warm extruder (Metalchem S-60, Gliwice, Poland). The extrusion conditions were as follows: cylinder temperature under stress of increasing pressure 90 °C, 100 °C in the high-pressure zone, 110 °C in the head, with a screw diameter of 6 mm and a speed of 52 rpm. The fish were divided into two groups: control group (CON), which received a diet without supplements, and experimental group (GOS), fed a diet supplemented with 2% GOS (Bi₂tos[®], Clasado Biosciences Ltd., Jersey, UK). The feeding trial lasted 50 days, from 30.04. to 19.06.2018. Every ten days, individual weights of all fish in each tank were measured, and the feed ration and rearing indices were calculated.

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the feed.

Ingredient	Composition (%)	
	CON ¹¹	GOS ¹²
Wheat meal	32.8	30.8
Fish meal ¹	12.3	12.3
Blood meal ²	10.0	10.0
DDGS ³	11.0	11.0
Soybean meal ⁴	15.0	15.0
Rapeseed meal ⁵	10.0	10.0
Fish oil ⁶	4.6	4.6
Soybean lecithin ⁷	1.0	1.0
Vitamin-mineral premix ⁸	1.5	1.5
Vitamin premix ⁹	0.1	0.1
Choline chloride	0.2	0.2
Fodder chalk	1.5	1.5
Prebiotic ¹⁰	0	2
Proximate composition (% dry matter)		
Crude protein	35.06	
Essential amino acids (g 100 g ⁻¹ of crude protein)		
Arginine	4.53	
Histidine	2.80	
Lysine	3.50	
Tryptophan	1.04	
Phenylalanine + Tyrosine	4.96	
Methionine + Cysteine	1.75	
Threonine	3.13	
Leucine	6.72	
Isoleucine	3.90	
Valine	4.97	

Table 1. Cont.

Ingredient	Composition (%)	
	CON ¹¹	GOS ¹²
Total lipid		9.08
Crude fiber		3.93
Total phosphorus		0.83
Calcium		1.36
Ash		7.17
Gross energy (MJ·kg ⁻¹)		18.51

¹ Danish fishmeal, Type F, 72% total protein, 12% fat, FF Skagen, Denmark. ² AP 301 P, 92% total protein, APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, UK. ³ Dried Distillers Grains with Solubles, stillage >45% total protein, <6% ash. ⁴ Toasted, 46%–47% total protein. ⁵ 33% total protein, 2% fat. ⁶ Agro-fish, Kartoszyno, Poland. ⁷ BergaPure, deoiled lecithin, 97% pure lecithin, Berg+Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany. ⁸ Polfamix W, BASF Polska Ltd. Kutno, Poland – 1 kg contains: vitamin A 1,000,000 IU, vitamin D₃ 200,000 IU, vitamin E 1.5 g, vitamin K 0.2 g, vitamin B₁ 0.05 g, vitamin B₂ 0.4 g, vitamin B₁₂ 0.001 g, nicotinic acid 2.5 g, D-calcium pantothenate 1.0 g, choline chloride 7.5 g, folic acid 0.1 g, methionine 150.0 g, lysine 150.0 g, Fe 2.5 g, Mn 6.5 g, Cu 0.8 g, Co 0.04 g, Zn 4.0 g, J 0.008 g, carrier up to 1000.0 g. ⁹ Vitazol AD₃E, BIOWET Drwalew, Poland – 1 kg contains: vitamin A 50,000 IU, vitamin D₃ 5000 IU, vitamin E 30.0 mg, vitamin C 100.0 mg. ¹⁰ Bitos@trans-galactooligosaccharide (GOS), Clasado Ltd. ¹¹ Control group without GOS supplementation. ¹² Group supplemented with galactooligosaccharides.

2.2. Tissue Collection and RNA Isolation

Samples of the skin mucosa were collected from randomly selected individuals (n = 8) with an average body weight of 500 g (±10 g). The mucus was gently scraped from the skin using a sterile glass slide and stabilized in 3 ml of RNAlater (Invitrogen, Waltham, MA, USA). The samples were stored at –80 °C until total RNA isolation. Prior to total RNA isolation, the samples of skin mucosa were homogenized with the TissueRuptor homogenizer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) in TRIzol@LS Reagent (Ambion/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The lysate was processed using a EURx Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland). The RNA quality and quantity were determined by gel electrophoresis using 2% agarose gel (to verify the integrity of 18S and 28S rRNA) and NanoDrop 2000 (to measure the absorbance at 260/280 nm) (Scientific Nanodrop Products, Wilmington, DE, USA). RNA was frozen at –80 °C prior to downstream analyses.

2.3. Reverse Transcription–Quantitative PCR (RT-qPCR)

Reverse transcription (RT) was performed using a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific/Fermentas, Vilnius, Lithuania), following the manufacturer's recommendations. Obtained cDNA was diluted to 70 ng/μL and stored at –20 °C. RT-qPCR reactions were conducted with a total volume of 10 μL. The reaction mixture contained 1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific/Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 μM of each primer (Sigma–Aldrich, Germany), and 2 μL of diluted cDNA. Thermal cycling was performed in a LightCycler II 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The qPCR amplification comprised an initial denaturation step for 15 min at 95 °C, followed by 40 cycles of denaturation (10 s at 95 °C), annealing (15 s at 58 °C), and extension (30 s at 72 °C). Fluorescence was measured at the end of each extension step. The thermal program was completed by the melting curve, which was generated by increasing the temperature in small increments up to 98 °C and measuring the fluorescence of the melting amplicon. Each RT-qPCR reaction was conducted in triplicates (reference genes) or duplicates (target genes). Oligonucleotide primers were synthesized based on sequences from literature or in-house designed. The selection of reference and target genes and primer details are described in the Section 2.4. "Gene selection".

2.4. Gene Selection

2.4.1. Reference Genes

Reference genes for the relative gene expression analysis were selected based on a two-step selection process. First, the related literature was studied to pinpoint the relevant panel of reference genes for carp [24,33–35]. Second, the RT-qPCR analysis was performed on a full set of cDNA samples to determine the reference genes' quality and stability in the samples from skin mucosa. The RT-qPCR for reference genes was performed based on the methodology described in Section 2.3. "Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)". Table 2 presents the list of the reference genes and the respective oligonucleotide primers. Ct values from CON and GOS groups were analyzed using RefFinder [36]. RefFinder integrates different algorithms that are commonly used in reference genes analysis, including BestKeeper [37], NormFinder [38], geNorm [39], and the comparative delta-Ct method [40]. Analysis of the panel of reference genes allowed for selecting the best combination of the reference genes for relative expression of the target genes.

Table 2. Reference genes for reverse transcription–quantitative PCR (RT-qPCR) in common carp.

Name	Gene	NCBI Gene ID	Primer Sequences (5'→3')	Ref
Beta-actin	<i>ACTB</i>	109073280	F:ATCCGTAAAGACCTGTATGCCA R:GGGGAGCAATGATCTTGATCTTCA	[24]
Elongation factor 1-alpha	<i>EF-1α</i>	109111735	F:TGGAGATGCTGCCATTGT R:TGCAGACTTCGTGACCTT	[34]
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	<i>GAPDH</i>	109106399	F:ATCTGACGGTCCGTCT R:CCAGCACCGGCATCAAA	[34]
18S ribosomal RNA	<i>18s rRNA</i>	FJ710826.1	F:GAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC R:AATCTGTCAATCCTTCCGIGTCC	[35]
40S ribosomal protein S11	<i>40s s11</i>	109061205	F:CCGTGGGTGACATCGTTACA R:TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	[33]

2.4.2. Target Genes

The selection of the target genes was based on the literature on the immune responses generated in SALT [5,41–44]. First, a list of immunological processes that occur in SALT to protect fish from external factors was determined. These processes include defense against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, viruses, fungi, and yeast; hydrolyzing peptide and glycosidic bonds of the cell walls; promoting phagocytosis; activating complement pathways; turning off opsonization; and stress response. Next, proteins involved in these processes were pinpointed, and the underlying genes were considered target genes for this study. In effect, a comprehensive panel of the genes expressed in the fish skin mucosa was selected. A DNA sequence of the respective target genes was derived from a gene-related section of the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). The RT-qPCR primers were designed using Primer-BLAST [45], which is a primer designing tool implemented in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). The RT-qPCR primers were designed based on the following criteria: amplicon size between 70 and 200 bp, span of an exon–exon junction (does not apply to *CRP* gene due to the presence of only one exon), optimal melting temperatures around 60 °C, the 3' end of primers contains a C or G residue (if possible), CG content around 40%–60%, and exclusion of primer–dimer formation. The list of the analyzed genes, including their biological function and primer sequences, is presented in Table 3.

Table 3. Immune-related genes and primer sequences for RT-qPCR analysis of the skin mucosa in common carp.

Name	Gene	Gene ID	Function ¹	Primer Sequences (5'→3')	Ref. ²
Acute-phase protein					
C-reactive protein	<i>CRP</i>	109083752	Host defense: it promotes agglutination, bacterial capsular swelling, phagocytosis, and complement fixation through its calcium-dependent binding to phosphorylcholine.	F:AGCTTTGGAAAATTCCGGTTCACC R:ACTCACCTCGTGCTACTGC	This study
Antimicrobial peptides (AMP)					
Histone H2A.V-like	<i>His2Av</i>	109068402	Main role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication, and chromosomal stability	F:CTGGTGGAGGTGTGATTCTT R:AGCGGGAACACTACACGGTCTT	This study
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 5-like	<i>GGGT5L</i>	109112827	Key role in the gamma-glutamyl cycle and maintains normal redox status	F:AGCTGCATATCATGGACGAGTT R:CTCCGCAGAACCAGAGTGCT	This study
Cytokines					
Interleukin 1 beta-like	<i>IL1β</i>	109097442	Mediator of the inflammatory response, and is involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis	F:AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT R:CCTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA	[46]
Interleukin 4	<i>IL4</i>	109064937	Participates in at least several B-cell activation processes as well as other cell types. It is a costimulator of DNA-synthesis. It induces the expression of class II MHC molecules on resting B-cells	F:TTTCTGGGCTGTCTGGTGCCAA R:TTTCTGTGAGTACGGAAATGCTCA	[47]
Interleukin 8-like	<i>IL8</i>	109085034	Chemotactic factor that attracts neutrophils, basophils, and T-cells, but not monocytes. It is also involved in neutrophil activation. It is released from several cell types in response to an inflammatory stimulus	F:GATGCAAATGCCCTCAAATACA R:GGCTTTGACGTTCCCTTTTG	[43]
Interleukin 10-like	<i>IL10</i>	109076801	Major immune-regulatory cytokine that acts on many cells of the immune system where it has profound anti-inflammatory functions, limiting excessive tissue disruption caused by inflammation	F:CGCCAGCATAAAGAAGACTCGT R:TGCCAAATACTGCTCGATGT	[46]
Interferon gamma	<i>IFNγ</i>	109053615	Produced by lymphocytes activated by specific antigens or mitogens	F:TGAGCTTAAAGAATGTGTGGCCCAA R:ACTCCATATGTGACGGCTTTTGGT	[47]
Lectins					
C-type lectin 4	<i>CLEC4M</i>	109066444	Binds carbohydrates mannose and fucose	F:TCAACTGGTCAGAGGCACGA R:GAAAGGCCCACTCTTCATCGTC	This study
Lysozymes					
Lysozyme C	<i>LyzC</i>	109090952	Protection against pathogens	F:ATGAAGGTGACTATTGCTGTCTTG R:AGTAGGCCCGTGACACATAGTT	This study
Lysozyme G	<i>LyzG</i>	109087581	Protection against pathogens	F:GGCCTTCAGACGATACTTACCA R:TGGAAGCCTCGACACCCTTT	This study

Table 3. Cont.

Name	Gene	Gene ID	Function ¹	Primer Sequences (5'→3')	Ref. ²
Mucins					
Mucin-5AC-like	<i>M5ACL</i> ³ (LOC109110796)	109110796	Forming protective mucous barriers on epithelial surfaces	F:CGATCAGTGCTATGTCCTGTCA R:ACAGTTGGGCTCACGTTTGT	This study
Peroxidases					
Myeloperoxidase-like	<i>MPO</i>	109052003	Produces hypochlorous acid from hydrogen peroxide and chloride anion during the neutrophil's respiratory burst, oxidizes tyrosine to the tyrosyl radical using hydrogen peroxide as an oxidizing agent	F:CAACCTGGTCCACAAGGTGTAGC R:GGCAGACTGTTGTCCTGTGG	This study
Proteases					
Cathepsin B	<i>CTSB</i>	109064698	Bacteriolytic activity against fish pathogen	F:CACTGACTGGGGTGATAATGGATA R:GGTGCTCATTTCAGCCCTCCT	This study
Cathepsin D	<i>CTSD</i>	109105685	Regulates production of parasin I	F:CGACGGCTCGCCAAAATGAG R:AGAGGAATCCGTACAATTGCGT	This study
Oxidoreductase					
Thioredoxin-like	<i>TXNL</i> ³ (LOC109108046)	109108046	Cell redox homeostasis	F:GCGGGCTGCTGCTTTGACTG R:GTCGAAGGCAGGCTTATCCTCA	This study
Reference genes					
Beta-actin	<i>ACTB</i>	109073280	Actins are highly conserved proteins that are involved in cell motility, structure, integrity, and intercellular signaling	F:ATCCGTAAAGACCTGTATGCCA R:GGGGAGCAATGATCTTGATCTTCA	[24]
40S ribosomal protein S11	<i>40s s11</i>	109061205	Relation with viral mRNA translation and activation of the mRNA pathways upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	F:CCGTGGGTGACATCGTTACA R:TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	[33]

¹ gene function derive from GeneCards (<http://www.genecards.org>); ² primers marked as "this study" were designed using Primer-BLAST [45]; ³ name given for this experiment.

2.5. Relative Quantification of Gene Expression and Statistical Analysis

Normalization of the expression levels (Ct values) of the target genes was performed with two selected reference genes (*ACTB* and *40s s11*). The geometric mean of Ct values between reference genes was used to calculate ΔCt , according to the formula: $\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$. Relative gene expression was calculated with the $\Delta\Delta Ct$ algorithm, in which CON was considered a calibrator. The fold change in the target genes in GOS was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [48]. To compare the data between GOS and CON, a Student's *t*-test was performed using the SAS Enterprise Guide 9.4 program (SAS Institute, Cary, NC, USA). The difference between GOS and CON was considered significant when $p < 0.05$. Figures were prepared using GraphPad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Reference Genes

The results of the reference genes used for relative gene expression analysis in skin mucosa of common carp are presented in Figure 1. All computational methods (the comparative delta-Ct method, BestKeeper, NormFinder, and GeNorm) showed that the two genes that are most stable in the carp skin mucosa are: *40s s11* and *ACTB*. In addition, GeNorm indicated that the best set of the candidate genes for normalization of the experiment would be the geometric mean of the *ACTB/40s s11* genes. In the following calculations of the relative immune-related gene expression analysis, the geometric mean of those two reference genes was used.

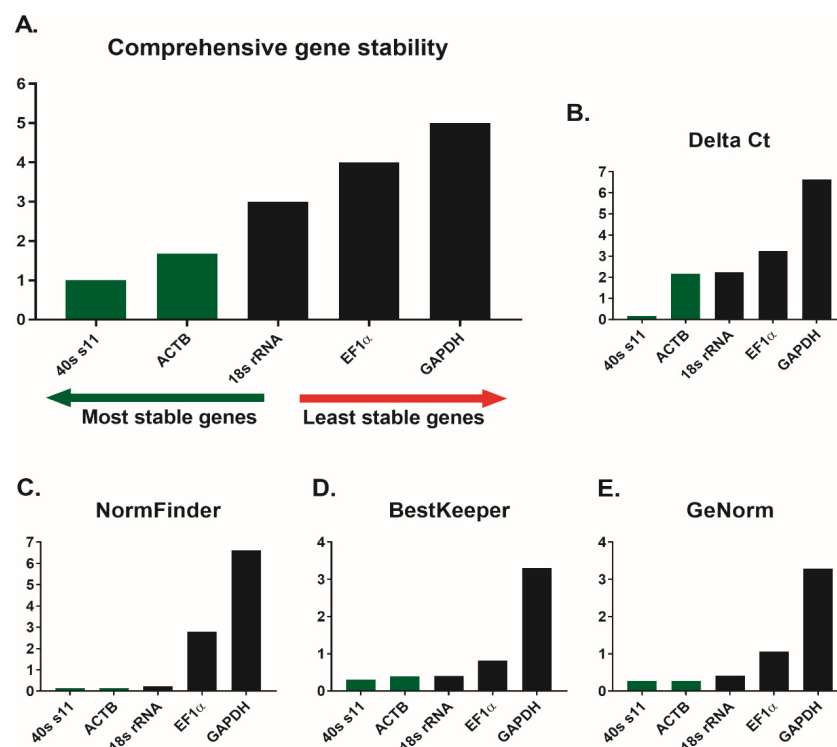


Figure 1. Analyses of the candidate reference genes for gene expression study in skin mucosa of common carp (*Cyprinus carpio*) using different algorithms: (A) comprehensive gene stability, (B) Delta Ct, (C) Normfinder, (D) BestKeeper, and (E) GeNorm. Candidate reference genes: Beta-actin (*ACTB*), Elongation factor 1-alpha (*EF-1 α*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (*GAPDH*), 18S ribosomal RNA (*18s rRNA*), and 40s ribosomal protein s11 (*40s s11*). Dataset was generated for GOS-supplemented and control animals ($n = 8$) using RT-qPCR. qPCR reactions were performed in triplicates. RefFinder was used to calculate the gene stability values. *40s s11* and *ACTB* (labeled green) were selected as the most stable pair of reference genes for skin mucosa study in carp. Figures were prepared using GraphPad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3.2. Immune-Related Gene Expression

The relative gene expression analysis for immune-related genes in the carp skin mucosa is shown in Figure 2. The majority of the genes were upregulated in GOS vs. CON. Only CRP and LyzC were downregulated. Statistically significant differences at the mRNA level were demonstrated for INF γ and LyzG genes, which were upregulated in GOS ($p \leq 0.05$). The CRP gene was significantly downregulated in GOS ($p \leq 0.01$). Furthermore, a suggestive statistical trend was found for the MPO gene, which was upregulated in GOS compared to CON ($0.05 < p < 0.1$).

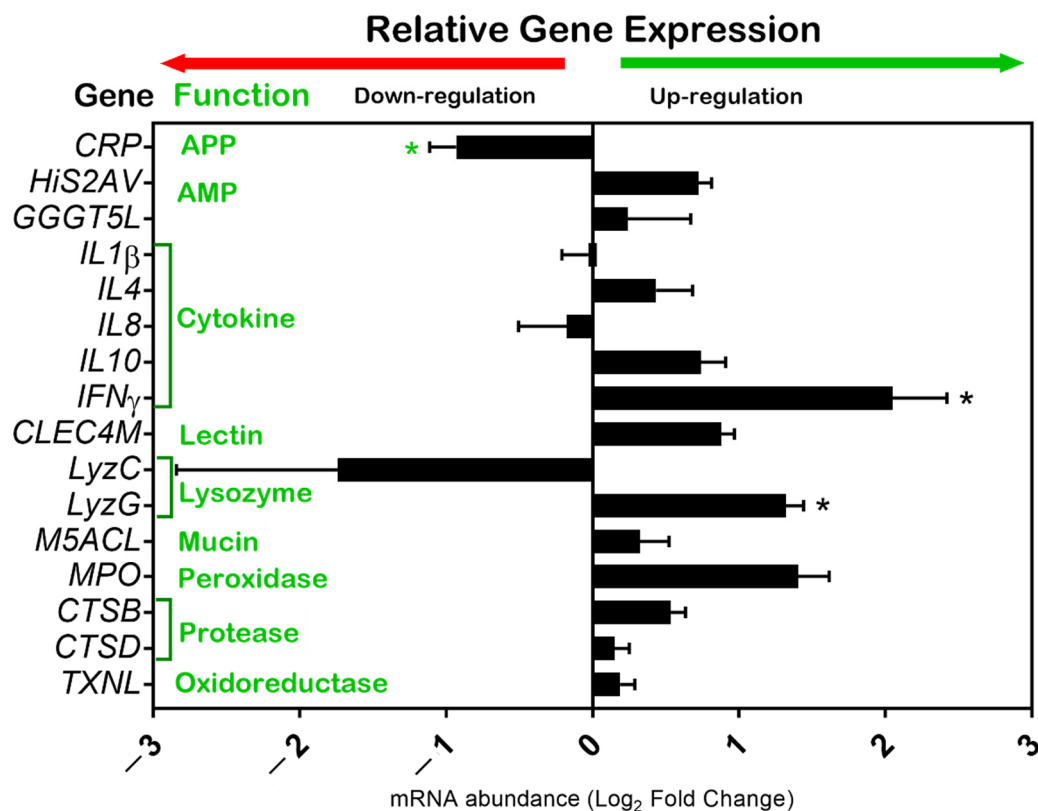


Figure 2. Immune-related gene expression signatures identified in the skin mucosa of common carp (*Cyprinus carpio*) supplemented with GOS. The Y-axis shows a list of genes (black) and enzymatic function of encoded proteins (green). Horizontal bars on the X-axis indicate the relative mRNA abundance of the genes of GOS-supplemented animals ($n = 8$). Gene expression analysis was carried out with RT-qPCR. qPCR reactions were performed in triplicates. The geometric mean of the 40s s11 and ACTB reference genes was used to calculate dCt values. The relative gene expression was calculated with the ddCt formula ($FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). FC values were transformed and presented as Log₂FC. The standard error of the means (SEM) shows the distribution of the Ct values. Normalized data (dCt values) of control and treated groups were compared with the Student's *t*-test. Significant differences ($p < 0.05$) were labeled with an asterisk (*). Figures were prepared using GraphPad Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Abbreviations used in the figure: APP—acute-phase proteins; AMP—antimicrobial proteins.

4. Discussion

Expression of the immune-related genes gives insight into the mechanisms of the innate immune responses. In aquaculture, replacing antibiotics with prebiotics, probiotics, or synbiotics, increases immunological competence and resistance to diseases in an environmentally friendly way [49]. The immunomodulatory role of prebiotics results from direct interactions with the innate immune system and/or indirectly, by selectively stimulating the growth of commensals inhabiting the host's mucosa [50,51]. This way, prebiotics can stimulate intestinal epithelial cells to release cytokines that modulate the spectrum of the mucosal immune system, including dendritic cells, T cells, and B

cells, which, in turn, trigger the transcription of immune-related genes (e.g., tumor necrosis factor α , or lysozyme). This process leads to an increase in innate immune responses [52,53].

4.1. mRNA Expression Stability of the Reference Genes

One of the most important factors that can skew the results of the relative gene expression at the mRNA level is the selection of the most stable reference genes for a given tissue. To our knowledge, the information regarding the most suitable genes for normalizing the RT-qPCR data in the skin mucosa of common carp was lacking. In fish, the most common reference genes are *ACTB* [54], *B2M*, *18s rRNA*, *EF1 α* , and *GAPDH* [55–58]. This diversity may be due to the species characteristics, individual tissues, age, and type of experiment. Thus, it is necessary to test and compare different housekeeping genes in all experimental conditions [59]. In this study, five candidate genes were evaluated for the normalization of RT-qPCR in the skin mucosa of the common carp. The highest expression stability in skin mucosa was found for *ACTB* and *40s s11* genes. Gene *ACTB* encodes actin. All actins are highly conserved and involved in cell motility, structure, integrity, and intercellular signaling. *ACTB* is a protein found in most vertebrate cells as components of the cytoskeleton (<https://www.genecards.org/>). The protein encoded by the *40s s11* gene is a member of the S17P family of ribosomal proteins. This family is a component of the small ribosome subunit (40S). The main function of this gene is binding RNA and rRNA. Protein *40s s11* is also a structural component of the ribosome (<https://www.genecards.org/>). In our experiment, the mRNA expression of *ACTB* and *40s s11* genes was not affected by the experimental factor (GOS). For this reason, they are good candidates for internal control genes in RT-qPCR experiments.

4.2. Immune-Related Gene Expression in Skin Mucosa

The obtained results of the immune-related gene expression in response to GOS supplementation showed a significant increase in the genes associated with antiviral (*IFN γ*) and antimicrobial (*LyzG*) immune responses. On the other side, the *CRP* gene representing the acute phase response, was decreased in the GOS-supplemented group. *IFN γ* is an antiviral and immunoregulatory cytokine that is necessary for cellular defense. It is produced by T cells and natural killer cells as a dimerized soluble glycoprotein [60]. Lysozymes are an important element of innate immunity. They are able to catalyze hydrolysis of the bacterial glycosidic bonds. Several types of lysozymes have been described, such as lysozyme C (chicken), lysozyme G (goose), phage, bacterial and plant lysozymes [61]. In fish, lysozyme is found in mucus, serum, and ova [62] and is found in two forms, C and G. Fish lysozymes are thought to have a much more bactericidal effect than those produced by the higher vertebrates [61]. *CRP* belongs to the family of soluble proteins that are involved in the acute phase reaction (APR) to injury, damage, or infection. *CRP* is able to bind to phosphorylcholine, pneumococcal C-polysaccharide, and phospholipids, as well as to autogenic compounds, such as apoptotic nuclear components and other intracellular components released after cell death [63]. It also binds harmful molecules, such as mercury, increases phagocytic clearance, and triggers complement activation via the classical pathway [64].

4.3. Effects of GOS in Fish

Several papers have reported improvement in the immunological properties of the fish skin mucosa after application of the GOS prebiotic. They refer to the increase in the activity of immunological factors at the protein level in the skin mucosa. Hoseinifar et al. [65] compared the effects of three prebiotics (FOS, GOS, and inulin) in common carp. A significant increase in dermal lysozyme activity in the experimental group fed GOS was demonstrated, which is in line with the present study. Hoseinifar et al. [23] demonstrated similar effects in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with 2% GOS. The supplementation of GOS (1%–2%) in the nutrition of the white Caspian fish (*Rutilus frisii kutum*) for eight weeks also increased the lysozyme activity and total immunoglobulin level [66]. The introduction of XOS in diets fed to the white Caspian fish also increased bactericidal activity in the skin mucus [67]. In goldfish (*Carassius auratus auratus*), 1% and 2% GOS significantly improved the

immune parameters of the skin mucus (lysozyme and total protein) compared to the control and to the reduced proportion of GOS in the mix (0.5%) [68]. These studies suggest that dietary prebiotics (including GOS) indirectly support mucosal immunity. However, further research is needed on total IgA initiation by prebiotics in fish to fully understand the effect of immunomodulation [69].

The effects of GOS supplemented to the fish also improved intestinal function and muscle structure in common carp (*Cyprinus carpio*). The feeding trial reported in this paper led to the discovery that GOS provided in the diet improved the histological picture of the intestines, including the height and thickness of intestinal villi. Such morphological changes in the fish guts increased the absorptive surface of the small intestine. The elevated ratio of villi height to intestinal crypt depth suggests improved maturity of the intestinal mucosa of the GOS-supplemented carp diet (Ziółkowska et al., submitted). Regarding the muscle structure, the addition of 2% GOS increased the diameter and density of the white muscle fibers responsible for the marbling of the fish meat. Along with that, the percentage of muscle fiber atrophy decreased (Ziółkowska, personal communication). In conclusion, GOS supplementation in carp improved intestinal and muscular morphology.

4.4. Immunomodulatory Role of GOS

GOS used in this study was produced from lactose by galactosyltransferases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41,171 isolated from a human stool sample [70]. The immunomodulatory effects of this particular compound have been well-established in human and poultry. The introduction of GOS to human diets increased fecal bifidobacteria abundance while reducing less desirable strains [71–73]. Dietary GOS significantly increased phagocytosis, stimulated NK activity, increased levels of anti-inflammatory cytokine (IL-10) and decreased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1, and TNF- α) in elderly people [72]. Supplementation of GOS in diets of overweight adults led to an increased abundance of colonic *Bifidobacteria*, as well as increased production of fecal secretory IgA [71]. GOS has also been reported to alleviate the syndromes of irritable bowel syndrome [74], prevented the symptoms of traveler's diarrhea [75], and exerted positive effects on GI symptoms, including bloating, abdominal pain, and flatulence [76].

The immunomodulatory effects of GOS used for early stimulation of the chicken microbiota through *in ovo* technology have been widely documented [77–79]. Transcriptomic analysis revealed that GOS delivered *in ovo* modulated genes associated with lymphocyte proliferation, activation and differentiation, as well as cytokine production in the caecal tonsils of broiler chickens [78]. It was also found that GOS delivered *in ovo* increased expression of the genes related to mucosal immune response, intestinal barrier function, and nutrient sensing in the chicken gastrointestinal tract [77]. Particularly beneficial effects of GOS delivered *in ovo* were determined during heat stress in broiler chickens. Even a short-term increase in ambient temperatures resulted in elevated expression of the genes associated with immune response and stress response [80]. These effects were alleviated by GOS delivered *in ovo*, most likely due to maintaining intestinal eubiosis [80]. Furthermore, GOS delivered *in ovo* mitigated harmful effects of chronic heat stress on the performance and welfare of broiler chickens [81], as well as meat composition and quality [82].

5. Conclusions

Supplementation of the standard diets with GOS modulated innate immune responses of common carp. In this study, we found that dietary GOS exerted immunomodulatory effects on skin mucosa, which was manifested by mRNA expression of the genes involved in cytokine, lysozyme, and acute-phase protein production. In conclusion, GOS activated immunomodulatory pathways leading to gene expression modulation in SALT of common carp.

Author Contributions: Conceptualization, J.M., A.S.; methodology, E.P., J.M., and A.S.; formal analysis, E.P.; investigation, E.P. and A.S.; resources, J.M. and A.S.; data curation, E.P. and A.S.; writing—original draft preparation, E.P.; writing—review and editing, E.P., J.M., and A.S.; visualization, A.S.; supervision, A.S.; funding acquisition, A.S. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Ministry of Higher Education statutory activity of the Department of Animal Biotechnology and Genetics, BN 51/2019.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Wang, S.; Wang, Y.; Ma, J.; Ding, Y.; Zhang, S. Phosvitin plays a critical role in the immunity of zebrafish embryos via acting as a pattern recognition receptor and an antimicrobial effector. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22653–22664. [[CrossRef](#)]
2. Hawkes, J.W. The structure of fish skin—I. General organization. *Cell Tissue Res.* **1974**, *149*, 147–158. [[CrossRef](#)]
3. Fast, M.; Sims, D.; Burka, J.; Mustafa, A.; Ross, N. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **2002**, *132*, 645–657. [[CrossRef](#)]
4. Arasu, A.; Kumaresan, V.; Sathyamoorthi, A.; Palanisamy, R.; Prabha, N.; Bhatt, P.; Roy, A.; Thirumalai, M.K.; Gnanam, A.J.; Pasupuleti, M.; et al. Fish lily type lectin-1 contains β -prism architecture: Immunological characterization. *Mol. Immunol.* **2013**, *56*, 497–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Swain, P.; Dash, S.; Sahoo, P.; Routray, P.; Sahoo, S.; Gupta, S.; Meher, P.; Sarangi, N. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *22*, 38–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ángeles Esteban, M. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunol.* **2012**, *2012*, 1–29. [[CrossRef](#)]
7. Lazado, C.C.; Caipang, C.M.A. Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 990–998. [[CrossRef](#)]
8. Streilein, J.W. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): Origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80* Suppl, 12s–16s. [[CrossRef](#)]
9. Xu, Z.; Parra, D.; Gomez, D.; Salinas, I.; Zhang, Y.-A.; von Gersdorff Jorgensen, L.; Heinecke, R.D.; Buchmann, K.; LaPatra, S.; Sunyer, J.O. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13097–13102. [[CrossRef](#)]
10. Austin, B. The bacterial microflora of fish, revised. *Sci. World J.* **2006**, *6*, 931–945. [[CrossRef](#)]
11. Musharrafieh, R.; Tacchi, L.; Trujeque, J.; LaPatra, S.; Salinas, I. *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 80–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Boutin, S.; Bernatchez, L.; Audet, C.; Derôme, N. Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. *Vet. Microbiol.* **2012**, *155*, 355–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Carbajal-González, M.; Fregeneda-Grandes, J.; Suárez-Ramos, S.; Rodríguez Cadenas, F.; Aller-Gancedo, J. Bacterial skin flora variation and in vitro inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. *Dis. Aquat. Organ.* **2011**, *96*, 125–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Horsley, R.W. The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment. *J. Appl. Bacteriol.* **1973**, *36*, 377–386. [[CrossRef](#)]
15. Cahill, M.M. Bacterial flora of fishes: A review. *Microb. Ecol.* **1990**, *19*, 21–41. [[CrossRef](#)]
16. Sullam, K.E.; Essinger, S.D.; Lozupone, C.A.; O'Connor, M.P.; Rosen, G.L.; Knight, R.; Kilham, S.S.; Russell, J.A. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol. Ecol.* **2012**, *21*, 3363–3378. [[CrossRef](#)]
17. van Kessel, M.A.H.J.; Dutilh, B.E.; Neveling, K.; Kwint, M.P.; Veltman, J.A.; Flik, G.; Jetten, M.S.M.; Klaren, P.H.M.; Op den Camp, H.J.M. Pyrosequencing of 16s rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express* **2011**, *1*, 1–9. [[CrossRef](#)]
18. Kazuñ, B.; Kazuñ, K.; Siwicki, A.K. Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w ochronie zdrowia ryb. *Komunikaty Rybackie* **2016**, *4*, 14–17.

19. Hoseinifar, S.H.; Khalili, M.; Khoshbavar Rostami, H.; Esteban, M.Á. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, *35*, 1416–1420. [[CrossRef](#)]
20. Do Huu, H.; Jones, C.M. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on juvenile spiny lobster *Panulirus homarus* (Palinuridae). *Aquaculture* **2014**, *432*, 258–264. [[CrossRef](#)]
21. Guerreiro, I.; Enes, P.; Rodiles, A.; Merrifield, D.; Oliva-Teles, A. Effects of rearing temperature and dietary short-chain fructooligosaccharides supplementation on allochthonous gut microbiota, digestive enzymes activities and intestine health of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles. *Aquac. Nutr.* **2016**, *22*, 631–642. [[CrossRef](#)]
22. Luna-González, A.; Almaraz-Salas, J.C.; Fierro-Coronado, J.A.; Flores-Miranda, M. del C.; González-Ocampo, H.A.; Peraza-Gómez, V. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture* **2012**, *362–363*, 28–32.
23. Hoseinifar, S.H.; Mirvaghefi, A.; Amoozegar, M.A.; Merrifield, D.L.; Ringø, E. In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquac. Nutr.* **2015**, *23*, 111–118. [[CrossRef](#)]
24. Liu, W.; Yang, Y.; Zhang, J.; Gatlin, D.M.; Ringø, E.; Zhou, Z. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 15–29. [[CrossRef](#)]
25. Torrecillas, S.; Makol, A.; Benítez-Santana, T.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Sweetman, J.; Izquierdo, M. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish Shellfish Immunol.* **2011**, *30*, 674–681. [[CrossRef](#)]
26. Grześkowiak, Ł.; Collado, M.C.; Vesterlund, S.; Mazurkiewicz, J.; Salminen, S. Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: Quantitative analysis. *Aquaculture* **2011**, *318*, 33–36. [[CrossRef](#)]
27. Rungrassamee, W.; Kingcha, Y.; Srimarut, Y.; Maibunkaew, S.; Karoonuthaisiri, N.; Visessanguan, W. Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* **2014**, *434*, 403–410. [[CrossRef](#)]
28. Hoseinifar, S.H.; Ringø, E.; Shenavar Masouleh, A.; Esteban, M.Á. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: A review. *Rev. Aquac.* **2016**, *8*, 89–102. [[CrossRef](#)]
29. Khalil, S.R.; Reda, R.M.; Awad, A. Efficacy of *Spirulina platensis* diet supplements on disease resistance and immune-related gene expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to herbicide atrazine. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *67*, 119–128. [[CrossRef](#)]
30. Ringø, E.; Song, S.K. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquac. Nutr.* **2016**, *22*, 4–24. [[CrossRef](#)]
31. Subramanian, S.; MacKinnon, S.L.; Ross, N.W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *148*, 256–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Miyatake, H. Carp. *Yoshoku* **1997**, *34*, 108–111.
33. Metz, J.R.; Huising, M.O.; Leon, K.; Verburg-van Kemenade, B.M.L.; Flik, G. Central and peripheral interleukin-1 and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Endocrinol.* **2006**, *191*, 25–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shrivastava, J.; Rašković, B.; Blust, R.; De Boeck, G. Exercise improves growth, alters physiological performance and gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2018**, *226*, 38–48. [[CrossRef](#)]
35. Zhang, W.; Jia, Y.; Ji, X.; Zhang, R.; Liang, T.; Du, Q.; Chang, Z. Optimal reference genes in different tissues, gender, and gonad of Yellow River carp (*Cyprinus carpio* var) at various developmental periods. *Pak. J. Zool.* **2016**, *48*, 1615–1622.
36. Xie, F.; Xiao, P.; Chen, D.; Xu, L.; Zhang, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *80*, 75–84. [[CrossRef](#)]
37. Pfaffl, M.W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 509–515. [[CrossRef](#)]

38. Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Ørntoft, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5245–5250. [[CrossRef](#)]
39. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, research0034.1. [[CrossRef](#)]
40. Silver, N.; Best, S.; Jiang, J.; Thein, S. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **2006**, *7*, 33. [[CrossRef](#)]
41. Dash, S.; Das, S.K.; Samal, J.; Thatoi, H.N. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: A review. *Iran. J. Vet. Res.* **2018**, *19*, 72–81. [[PubMed](#)]
42. Dawar, F.U.; Tu, J.; Xiong, Y.; Lan, J.; Dong, X.X.; Liu, X.; Khattak, M.N.K.; Mei, J.; Lin, L. Chemotactic Activity of Cyclophilin A in the Skin Mucus of Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and Its Active Site for Chemotaxis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Byadgi, O.; Chen, Y.-C.; Maekawa, S.; Wang, P.-C.; Chen, S.-C. Immune-Related Functional Differential Gene Expression in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) after Challenge with *Aeromonas sobria*. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gomez, D.; Sunyer, J.O.; Salinas, I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, *35*, 1729–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* **2012**, *13*, 134. [[CrossRef](#)]
46. Watanuki, H.; Ota, K.; Tassakka, A.C.M.A.R.; Kato, T.; Sakai, M. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **2006**, *258*, 157–163. [[CrossRef](#)]
47. Pietsch, C. Zearalenone (ZEN) and Its Influence on Regulation of Gene Expression in Carp (*Cyprinus carpio* L.) Liver Tissue. *Toxins* **2017**, *9*, 283. [[CrossRef](#)]
48. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
49. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Esteban, M.Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. *Rev. Aquac.* **2018**, *10*, 950–974. [[CrossRef](#)]
50. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; El Basuini, M.F.; Hossain, M.S.; Nhu, T.H.; Moss, A.S.; Dossou, S.; Wei, H. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac. Nutr.* **2017**, *23*, 148–159. [[CrossRef](#)]
51. Song, S.K.; Beck, B.R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, H.D.; Ringø, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 40–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cerezuela, R.; Meseguer, J.; Esteban, A. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. *J. Aquac. Res. Dev.* **2011**. [[CrossRef](#)]
53. Huynh, T.-G.; Shiu, Y.-L.; Nguyen, T.-P.; Truong, Q.-P.; Chen, J.-C.; Liu, C.-H. Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *64*, 367–382. [[CrossRef](#)]
54. Mo, F.; Zhao, J.; Liu, N.; Cao, L.-H.; Jiang, S.-X. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of CYP4T expression in crucian carp. *Genet. Mol. Biol.* **2014**, *37*, 500–507. [[CrossRef](#)]
55. McCurley, A.T.; Callard, G.V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: Male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol. Biol.* **2008**, *9*, 102. [[CrossRef](#)]
56. Filby, A.L.; Tyler, C.R. Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Mol. Biol.* **2007**, *8*, 10. [[CrossRef](#)]
57. Julin, K.; Johansen, L.-H.; Sommer, A.-I. Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *J. Virol. Methods* **2009**, *162*, 30–39. [[CrossRef](#)]
58. Jorgensen, S.M.; Kleveland, E.J.; Grimholt, U.; Gjoen, T. Validation of Reference Genes for Real-Time Polymerase Chain Reaction Studies in Atlantic Salmon. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8*, 398–408. [[CrossRef](#)]

59. Small, B.C.; Murdock, C.A.; Bilodeau-Bourgeois, A.L.; Peterson, B.C.; Waldbieser, G.C. Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tissues under varying physiological conditions. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *151*, 296–304. [[CrossRef](#)]
60. Yabu, T.; Toda, H.; Shibasaki, Y.; Araki, K.; Yamashita, M.; Anzai, H.; Mano, N.; Masuhiro, Y.; Hanazawa, S.; Shiba, H.; et al. Antiviral protection mechanisms mediated by ginbuna crucian carp interferon gamma isoforms 1 and 2 through two distinct interferon gamma-receptors. *J. Biochem.* **2011**, *150*, 635–648. [[CrossRef](#)]
61. Savan, R.; Aman, A.; Sakai, M. Molecular cloning of G type lysozyme cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **2003**, *15*, 263–268. [[CrossRef](#)]
62. Ellis, A.E. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **1999**, *9*, 291–308. [[CrossRef](#)]
63. Hicks, P.S.; Saunero-Nava, L.; Du Clos, T.W.; Mold, C. Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway. *J. Immunol.* **1992**, *149*, 3689–3694. [[PubMed](#)]
64. Falco, A.; Cartwright, J.R.; Wiegertjes, G.F.; Hoole, D. Molecular characterization and expression analysis of two new C-reactive protein genes from common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, *37*, 127–138. [[CrossRef](#)]
65. Hoseinifar, S.H.; Ahmadi, A.; Raeisi, M.; Hoseini, S.M.; Khalili, M.; Behnampour, N. Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac. Res.* **2017**, *48*, 3298–3307. [[CrossRef](#)]
66. Hoseinifar, S.H.; Zoheiri, F.; Dadar, M.; Rufchaei, R.; Ringø, E. Dietary galactooligosaccharide elicits positive effects on non-specific immune parameters and growth performance in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *56*, 467–472. [[CrossRef](#)]
67. Hoseinifar, S.H.; Sharifian, M.; Vesaghi, M.J.; Khalili, M.; Esteban, M.Á. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *39*, 231–236. [[CrossRef](#)]
68. Miandare, H.K.; Farvardin, S.; Shabani, A.; Hoseinifar, S.H.; Ramezanpour, S.S. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *55*, 479–483. [[CrossRef](#)]
69. Nawaz, A.; Bakhsh javaid, A.; Irshad, S.; Hoseinifar, S.H.; Xiong, H. The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *76*, 272–278. [[CrossRef](#)]
70. Tzortzis, G.; Goulas, A.K.; Gibson, G.R. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 412–416. [[CrossRef](#)]
71. Vulevic, J.; Juric, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G.R. A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 324–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Vulevic, J.; Drakoularakou, A.; Yaqoob, P.; Tzortzis, G.; Gibson, G.R. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 1438–1446. [[PubMed](#)]
73. Depeint, F.; Tzortzis, G.; Vulevic, J.; I’Anson, K.; Gibson, G.R. 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. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 785–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Silk, D.B.A.; Davis, A.; Vulevic, J.; Tzortzis, G.; Gibson, G.R. Clinical trial: The effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2009**, *29*, 508–518. [[CrossRef](#)]
75. Drakoularakou, A.; Tzortzis, G.; Rastall, R.A.; Gibson, G.R. A double-blind, placebo-controlled, randomized human study assessing the capacity of a novel galacto-oligosaccharide mixture in reducing travellers’ diarrhoea. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, 146–152. [[CrossRef](#)]
76. Vulevic, J.; Tzortzis, G.; Juric, A.; Gibson, G.R. Effect of a prebiotic galactooligosaccharide mixture (B-GOS®) on gastrointestinal symptoms in adults selected from a general population who suffer with bloating, abdominal pain, or flatulence. *Neurogastroenterol. Motil.* **2018**, *30*, e13440. [[CrossRef](#)]

77. Slawinska, A.; Dunislawska, A.; Plowiec, A.; Radomska, M.; Lachmanska, J.; Siwek, M.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLoS ONE* **2019**, *14*. [[CrossRef](#)]
78. Slawinska, A.; Plowiec, A.; Siwek, M.; Jaroszewski, M.; Bednarczyk, M. Long-Term Transcriptomic Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered In Ovo in Broiler Chickens. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0168899. [[CrossRef](#)]
79. Siwek, M.; Slawinska, A.; Stadnicka, K.; Bogucka, J.; Dunislawska, A.; Bednarczyk, M. Prebiotics and synbiotics—In ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 1–17. [[CrossRef](#)]
80. Slawinska, A.; Mendes, S.; Dunislawska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Avian model to mitigate gut-derived immune response and oxidative stress during heat. *Biosystems.* **2019**, *178*, 10–15. [[CrossRef](#)]
81. Slawinska, A.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Bertocchi, M.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Impact of galactooligosaccharides delivered in ovo on mitigating negative effects of heat stress on performance and welfare of broilers. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 407–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Tavaniello, S.; Slawinska, A.; Prioriello, D.; Petrecca, V.; Bertocchi, M.; Zampiga, M.; Salvatori, G.; Maiorano, G. Effect of galactooligosaccharides delivered in ovo on meat quality traits of broiler chickens exposed to heat stress. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 612–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.2. OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Elżbieta Pietrzak
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy
Ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej był następujący*:

1. **Pietrzak E., Dunisławska A., Siwek M., Zampiga M., Sirri F., Meluzzi A., Tavaniello S., Maiorano G., Sławinska A., 2020, Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat, Animals 2020, 10, 474, DOI: 10.3390/ani10030474, MNiSW₂₀₁₉ = 100 pkt., Impact Factor₂₀₁₉ = 2,323.**

Indywidualny udział Doktoranta 40 %

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

- a) Wykonanie analiz laboratoryjnych w zakresie: izolacja RNA, jego ocena ilościowa i jakościowa oraz przeprowadzenie reakcji RT-qPCR
- b) Opracowanie uzyskanych wyników, w tym przeprowadzenie analiz statystycznych
- c) Przygotowanie i złożenie manuskryptu (zarówno pierwsza wersja jak i po recenzjach), odpowiedź na recenzje, korespondencja z wydawnictwem

2. **Pietrzak E., Mazurkiewicz J., Sławinska A., 2020, Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides, Animals 2020, 10, 438, DOI: 10.3390/ani10030438, MNiSW₂₀₁₉ = 100 pkt., Impact Factor₂₀₁₉ = 2,323.**

Indywidualny udział Doktoranta 80 %

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

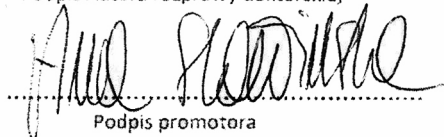
- a) Opracowanie metodyczne doświadczenia, w tym wytypowanie genów i zaprojektowanie starterów
- b) Pobór prób i wykonanie analiz laboratoryjnych w zakresie: izolacja RNA oraz jego ocena ilościowa i jakościowa, przeprowadzenie reakcji RT-qPCR
- c) Opracowanie uzyskanych wyników, w tym przeprowadzenie analiz statystycznych
- d) Przygotowanie i złożenie manuskryptu (zarówno pierwsza wersja jak i po recenzjach), odpowiedź na recenzje, korespondencja z wydawnictwem

Bydgoszcz, 27.10.2020

miejsowość, data

Pietrzak Elżbieta

Podpis Autora rozprawy doktorskiej



Podpis promotora

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

5.3. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Dr inż. Aleksandra Dunisławska

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Bydgoszcz, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule naukowym był następujący:

1. Pietrzak, E.; Dunisławska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Sławinska, A. *Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals* 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>

Opracowanie metodologii, opracowanie wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, co stanowi 10 % indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Elżbietę Pietrzak jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 10.06.20

Miejscowość, data

Dunisławska

Podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Prof. dr hab. inż. Maria Siwek

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Bydgoszcz, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący:

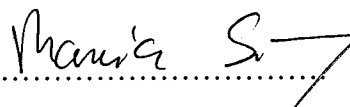
- 1. Pietrzak, E.; Dunisławska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Sławinska, A. Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>*

Opracowanie wyników, korekta i edycja manuskryptu, co stanowi 5 % indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Elżbietę Pietrzak jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

POZWAN 2.06.2020

Miejscowość, data



Podpis współautora

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów wskazujące na ich merytoryczny i procentowy wkład w powstanie każdej pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet, itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

CO-AUTHOR'S DECLARATION

Dr. Marco Zampiga

University of Bologna, Department of Agricultural and Food Sciences

Ozzano dell'Emilia, Italy

DECLARATION

I hereby declare that my contribution to the following scientific article was as follows:

1. *Pietrzak, E.; Dunislawaska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Slawinska, A. Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>*

Methodology and investigation, which represents 5 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

At the same time, I grant MSc Elżbieta Pietrzak (provide the professional title, first and last name of the candidate for the doctoral degree) the permission to include the above-mentioned paper(s) in the doctoral dissertation prepared based on the set of published, thematically related scientific articles.

Place, date

Bologna, 15/06/20

Co-author's signature



** In the case of two- or multi-author papers, candidate for the doctoral degree and co-author's statements are required. Statements should include their substantive and percentage contribution to the creation of the paper [e.g. creator of the research hypothesis, originator of the research, conducting particular research, (e.g. conducting specific experiments, development and collection of surveys etc.), result analysis, manuscript preparation etc.]. Contribution of a given author, including the candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow an accurate assessment of author's participation and role in the creation of each work.*

CO-AUTHOR'S DECLARATION

Professor Federico Sirri

University of Bologna, Department of Agricultural and Food Sciences

Ozzano dell'Emilia, Italy

DECLARATION

I hereby declare that my contribution to the following scientific article was as follows:

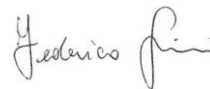
1. *Pietrzak, E.; Dunislawaska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Slawinska, A. Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>*

Methodology, investigation, resources, supervision, which represents 10 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

At the same time, I grant MSc Elżbieta Pietrzak the permission to include the above-mentioned paper(s) in the doctoral dissertation prepared based on the set of published, thematically related scientific articles.

Ozzano dell'Emilia, 09/06/2020

Place, date



Co-author's signature

** In the case of two- or multi-author papers, candidate for the doctoral degree and co-author's statements are required. Statements should include their substantive and percentage contribution to the creation of the paper [e.g. creator of the research hypothesis, originator of the research, conducting particular research, (e.g. conducting specific experiments, development and collection of surveys etc.), result analysis, manuscript preparation etc.]. Contribution of a given author, including the candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow an accurate assessment of author's participation and role in the creation of each work.*

CO-AUTHOR'S DECLARATION

Professor Adele Meluzzi

University of Bologna, Department of Agricultural and Food Sciences

Ozzano dell'Emilia, Italy

DECLARATION

I hereby declare that my contribution to the following scientific article was as follows:

1. *Pietrzak, E.; Dunislawaska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Slawinska, A. Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>*

resources and supervision, which represents 5 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

At the same time, I grant MSc Elżbieta Pietrzak the permission to include the above-mentioned paper in the doctoral dissertation prepared based on the set of published, thematically related scientific articles.

Meluzzi Adele, co-author's signature



.....

Ozzano, June 10th 2020

CO-AUTHOR'S DECLARATION

Professor Siria Tavaniello

University of Molise, Department of Agricultural, Environmental and Food Sciences

Campobasso, Italy

DECLARATION

I hereby declare that my contribution to the following scientific article was as follows:

1. Pietrzak, E.; Dunislawska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Slawinska, A. *Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals* 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>

Resources, methodology, participation in farm experiment, project administration, which represents 5 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

At the same time, I grant MSc Elżbieta Pietrzak (provide the professional title, first and last name of the candidate for the doctoral degree) the permission to include the above-mentioned paper(s) in the doctoral dissertation prepared based on the set of published, thematically related scientific articles.

Campobasso, 09.06.2020

.....

Place, date



Co-author's signature

** In the case of two- or multi-author papers, candidate for the doctoral degree and co-author's statements are required. Statements should include their substantive and percentage contribution to the creation of the paper [e.g. creator of the research hypothesis, originator of the research, conducting particular research, (e.g. conducting specific experiments, development and collection of surveys etc.), result analysis, manuscript preparation etc.]. Contribution of a given author, including the candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow an accurate assessment of author's participation and role in the creation of each work.*

CO-AUTHOR'S DECLARATION

Professor Giuseppe Maiorano

University of Molise, Department of Agricultural, Environmental and Food Sciences

Campobasso, Italy

DECLARATION

I hereby declare that my contribution to the following scientific article was as follows:

1. Pietrzak, E.; Dunislawska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Slawinska, A. *Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals* 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>

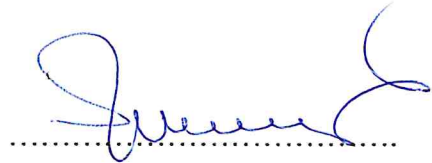
Methodology, project administration, funding acquisition, supervision, which represents 10 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

At the same time, I grant MSc Elzbieta Pietrzak the permission to include the above-mentioned paper(s) in the doctoral dissertation prepared based on the set of published, thematically related scientific articles.

Campobasso, 09.06.2020

.....

Place, date



Co-author's signature

* In the case of two- or multi-author papers, candidate for the doctoral degree and co-author's statements are required. Statements should include their substantive and percentage contribution to the creation of the paper [e.g. creator of the research hypothesis, originator of the research, conducting particular research, (e.g. conducting specific experiments, development and collection of surveys etc.), result analysis, manuscript preparation etc.]. Contribution of a given author, including the candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow an accurate assessment of author's participation and role in the creation of each work.

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Dr hab. inż. Anna Sławińska, prof. uczelni

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Bydgoszcz, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący:

1. Pietrzak, E.; Dunisławska, A.; Siwek, M.; Zampiga, M.; Sirri, F.; Meluzzi, A.; Tavaniello, S.; Maiorano, G.; Sławińska, A. *Splenic Gene Expression Signatures in Slow-Growing Chickens Stimulated in Ovo with Galactooligosaccharides and Challenged with Heat. Animals 2020, 10, 474, <https://doi.org/10.3390/ani10030474>*

Opracowanie koncepcji doświadczenia, opracowanie metodologiczne, analiza danych, pozyskanie finansowania, edycja i korekta manuskryptu, przygotowanie rycin, nadzór naukowy, co stanowi 10 % indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Pietrzak, E.; Mazurkiewicz, J.; Sławińska, A. *Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (Cyprinus Carpio) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides. Animals 2020, 10, 438, <https://doi.org/10.3390/ani10030438>*

Opracowanie koncepcji i metodologii, analiza uzyskanych danych, pozyskanie finansowania, edycja i korekta manuskryptu, opieka naukowa, co stanowi 10 % indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Elżbietę Pietrzak jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz 10.06.20
.....
Miejscowość, data

.....
Podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

prof. UPP dr hab. Jan Mazurkiewicz

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Instytut Zoologii,
Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury,
Poznań, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący:

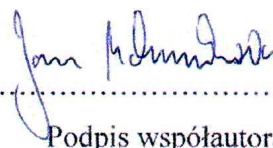
Pietrzak, E.; Mazurkiewicz, J.; Sławinska, A. Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (Cyprinus carpio) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides. Animals 2020, 10, 438, <https://doi.org/10.3390/ani10030438>

Opracowanie koncepcji i metodologii układu doświadczenia, wykonanie doświadczeń na zwierzętach, pozyskanie źródeł finansowania, korekta i edycja manuskryptu, co stanowi 10 % indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr inż. Elżbietę Pietrzak jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Poznań, 10.06.2020.

Miejscowość, data



Podpis współautora