



**UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY**
w Lublinie



**WYDZIAŁ
MEDYCYNY
WETERYNARYJNEJ**

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Artur Ciszewski

**WPLYW PODAWANIA *IN OVO* PROBIOTYKU
WIELOSZCZEPOWEGO ZAWIERAJĄCEGO EFEKTYWNE
MIKROORGANIZMY (EM PROVET) ORAZ CHELATU ZN-GLY NA
PARAMETRY ZDROWOTNE I PRODUKCYJNE ORAZ WSKAŹNIKI
HUMORALNEJ I KOMÓRKOWEJ ODPOWIEDZI
IMMUNOLOGICZNEJ U KURCZĄT BROILERÓW**

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. Łukasz Sebastian Jarosz, profesor UP

Lublin 2026

Składam serdeczne podziękowania
dr hab. Łukaszowi Sebastianowi Jaroszowi profesorowi UP
promotorowi tej rozprawy
za wprowadzenie w interesującą tematykę badawczą,
wnikliwe uwagi, zaangażowanie
oraz pomoc i wyrozumiałość w trakcie realizacji pracy doktorskiej

Składam serdeczne podziękowania

Pani Paulinie Zajączkowskiej

Prezes Zarządu Greenland Technologia Sp. Z o.o.

za wsparcie i umożliwienie mi zrealizowania podstawowych założeń pracy doktorskiej

oraz za okazaną życzliwość, otwartość

i cenne wskazówki w trakcie prowadzonych badań

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych.

Data 03.01.2026

Podpis promotora pracy

Jaworski Jacek

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data 03.01.2026

Podpis autora pracy

Gzrewski Artur

Spis treści

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	15
Dane bibliograficzne cyklu publikacji składających się na rozprawę doktorską oraz autora prac	19
WYKAZ SKRÓTÓW	33
1. WSTĘP	41
1.1. Wyzwania współczesnej produkcji drobiarskiej.....	41
1.2. Zdrowotność ptaków w okresie zarodkowym i powylęgowym	42
1.3. Technologia <i>in ovo</i> jako narzędzie wczesnej immunomodulacji	44
1.4. Rola cynku i probiotyków jako bioaktywnych czynników immunostymulujących u drobiu	45
1.5. Możliwości stosowania probiotyków wieloszczepowych opartych na efektywnych mikroorganizmach (EM) w produkcji drobiarskiej	48
1.6. Rola chelatu glicynowego cynku (Zn-Gly) jako immunomodulatora i czynnika wspierającego rozwój zarodków	50
1.7. Stosowanie probiotyku wieloszczepowego zawierającego EM oraz chelatu Zn-Gly w technologii <i>in ovo</i>	51
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	55
3. MATERIAŁ I METODY	57
Praca I.....	59
3.1. „Effect of combined <i>in ovo</i> administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens”	59
3.1.1. Okres inkubacji i schemat podawania <i>in ovo</i> probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly	59
3.1.2. Warunki utrzymania i odchowu ptaków	62
3.1.3. Ocena parametrów produkcyjnych	63
3.1.4. Pobieranie krwi i izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC).....	63
3.1.5. Ocena wybranych wskaźników humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej we krwi i śledzenie kurcząt	63
3.1.6. Analiza statystyczna.....	65
Praca II.....	67
3.2. „Effect of <i>In Ovo</i> Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks”	67

3.2.1. Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania <i>in ovo</i> probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchovu ptaków	67
3.2.2. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt	69
3.2.3. Oznaczanie stężenia IL-10, IFN- γ , TNF- α , kortykosteronu, Hsp 70, katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w surowicy i tkankach kurcząt.....	69
3.2.4. Oznaczanie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (T-AOC).....	69
3.2.5. Ocena stężenia białka	70
3.2.6. Ocena stężenia grup sulfhydrylowych (SH)	70
3.2.7. Ocena stężenia mostków bityrozynowych.....	70
3.2.8. Ocena stężenia formylokinureniny	70
3.2.9. Ocena stężenia wodoronadtlenków	70
3.2.10. Analiza statystyczna	71
Praca III.....	73
3.3. “Proteome Changes and Zn Concentration in Chicken Serum and Tissues Following <i>in ovo</i> Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate (Zn-Gly) – Preliminary Research”.....	73
3.3.1. Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania <i>in ovo</i> probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchovu ptaków	73
3.3.2. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt	75
3.3.3. Oznaczanie stężenia cynku w surowicy i tkankach kurcząt metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS).....	75
3.3.4. Analiza profilu peptydowego metodą MALDI–TOF MS	75
3.3.5. Analiza SDS-PAGE.....	76
3.3.6. Analiza statystyczna	76
Praca IV.....	78
3.4. “Effect of <i>in ovo</i> feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens”	78
3.4.1. Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania <i>in ovo</i> probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchovu ptaków	78
3.4.2. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt	80
3.4.3. Analiza składu i zawartości kwasów tłuszczowych	80
3.4.4. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w surowicy i tkankach.....	81

3.4.5. Analiza parametrów biochemicznych	81
3.4.6. Analiza statystyczna.....	81
Praca V	83
3.5. “Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered <i>in ovo</i> , on immune response in newly hatched chicks”	83
3.5.1. Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania <i>in ovo</i> probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly	83
3.5.2. Warunki utrzymania i odchowu ptaków	85
3.5.3. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt.....	85
3.5.4. Ocena parametrów produkcyjnych	86
3.5.5. Oznaczanie białek ostrej fazy i immunoglobulin w surowicy i tkankach kurcząt.....	86
3.5.6. Oznaczanie stężenia cytokin w surowicy i tkankach kurcząt	86
3.5.7. Analiza masy narządów limfatycznych	86
3.5.8. Analiza ekspresji mRNA immunoglobulin w jelicie biodrowym.....	87
3.5.9. Analiza statystyczna.....	87
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ	89
Praca I.....	89
4.1. “Effect of combined <i>in ovo</i> administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens”	89
4.1.1. Wpływ suplementacji <i>in ovo</i> na wylęgowość kurcząt brojlerów	89
4.1.2. Analiza parametrów produkcyjnych	89
4.1.3. Analiza odsetka komórek z ekspresją CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ i CD25 ⁺ w krwi obwodowej kurcząt brojlerów	90
4.1.4. Analiza odsetka komórek z ekspresją TCRγδ ⁺ i MHC klasy II ⁺ w krwi obwodowej kurcząt brojlerów.....	90
4.1.5. Analiza odsetka komórek z ekspresją Bu-1A ⁺ , CD79A ⁺ i monocytów/makrofagów KUL01 ⁺ w krwi obwodowej kurcząt brojlerów	90
4.1.6. Analiza odsetka komórek z ekspresją CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ i CD25 ⁺ w śledzionie kurcząt brojlerów	91
4.1.7. Analiza odsetka komórek z ekspresją TCRγδ ⁺ i MHC klasy II ⁺ w śledzionie kurcząt brojlerów	91
4.1.8. Analiza odsetka komórek z ekspresją Bu-1A ⁺ , CD79A ⁺ i monocytów/makrofagów KUL01 ⁺ w śledzionie kurcząt brojlerów	92

Praca II	93
4.2. “Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks”	93
4.2.1. Analiza aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) w surowicy i tkankach piskląt	93
4.2.2. Analiza stężenia cytokin TNF- α , IFN- γ i IL-10 w surowicy i tkankach kurcząt	94
4.2.3. Analiza stężenia kortykosteronu (CORT) w surowicy i tkankach kurcząt.....	95
4.2.4. Analiza stężenia białka szoku cieplnego (Hsp70) w surowicy i tkankach kurcząt	95
4.2.5. Analiza całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (T-AOC), stężenia białka, grup sulfhydrylowych (–SH), mostków bityrozynowych, formylkinureniny oraz wodoronadtlenków (DEPPD) w surowicy i tkankach kurcząt.....	96
Praca III.....	99
4.3. “Proteome Changes and Zn Concentration in Chicken Serum and Tissues Following in ovo Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate (Zn-Gly) – Preliminary Research”.....	99
4.3.1. Analiza stężenia Zn w surowicy i tkankach kurcząt.....	99
4.3.2. Analiza profilu peptydowego metodą MALDI–TOF MS	99
4.3.3. Analiza mas cząsteczkowych białek metodą SDS-PAGE.....	100
4.3.4. Analiza obecności i stężenia dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w wątrobie oraz jelicie cienkim i grubym.....	101
Praca IV.....	103
4.4. “Effect of <i>in ovo</i> feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens”	103
4.4.1. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w mięśni piersiowym	103
4.4.2. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w mięśni udowym	104
4.4.3. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w wątrobie	106
4.4.4. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w tkankach jelita cienkiego	107
4.4.5. Analiza wybranych parametrów biochemicznych w surowicy kurcząt	109
4.4.6. Analiza stężenia MDA, albuminy oraz stosunku MDA/albumina w woreczku żółtkowym w 18 DOI (24 godz. po suplementacji <i>in ovo</i>).....	110
4.4.7. Analiza stężenia MDA, albuminy oraz stosunku MDA/albumina w surowicy i tkankach kurcząt	110

Praca V	113
4.5. „Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered <i>in ovo</i> , on immune response in newly hatched chicks”	113
4.5.1. Analiza parametrów produkcyjnych	113
4.5.2. Analiza stężenia białek ostrej fazy w surowicy i tkankach kurcząt	113
4.5.3. Analiza stężenia immunoglobulin w surowicy i tkankach kurcząt	115
4.5.4. Analiza ekspresji mRNA IgA, IgM i IgY w jelicie biodrowym	116
4.5.5. Analiza stężenia cytokin w surowicy i tkankach kurcząt	117
4.5.6. Analiza względnej masy narządów limfatycznych u kurcząt	120
5. DYSKUSJA	121
Praca I	121
5.1. „Effect of combined <i>in ovo</i> administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens.”	121
5.1.1. Ocena wskaźnika wylęgowości	121
5.1.2. Ocena parametrów produkcyjnych	122
5.1.3. Ocena immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) i śledziony (SMLCs) kurcząt	123
Praca II	131
5.2. „Effect of <i>In Ovo</i> Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks.”	131
5.2.1. Ocena stężenia cytokin	132
5.2.2. Ocena stężenia enzymów antyoksydacyjnych	133
5.2.3. Ocena układu oksydacyjno-antyoksydacyjnego	135
Praca III	141
5.3. “Proteome Changes and Zn Concentration in Chicken Serum and Tissues Following <i>in ovo</i> Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate (Zn-Gly) – Preliminary Research”	141
5.3.1. Analiza stężenia Zn w surowicy i tkankach kurcząt	141
5.3.2. Analiza ekspresji mRNA dysmutazy ponadtlencowej Cu/Zn SOD	142
5.3.3. Analiza proteomu i peptydomu tkanek kurcząt	143
Praca IV	147
5.4. „Effect of <i>in ovo</i> feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens”	147

5.4.1. Analiza profilu lipidowego oraz profilu kwasów tłuszczowych u kurcząt	148
5.4.2. Analiza stężenia MDA w tkankach kurcząt.....	156
Praca V	159
5.5. „Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered <i>in ovo</i> , on immune response in newly hatched chicks.”	159
5.5.1. Ocena stężenia białek ostrej fazy w surowicy i tkankach kurcząt.....	160
5.5.2. Ocena stężenia i ekspresji mRNA immunoglobulin.....	164
5.5.3. Ocena parametrów produkcyjnych	167
5.5.4. Ocena masy narządów limfatycznych	169
5.5.5. Ocena stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych.....	170
6. WNIOSKI	175
7. STRESZCZENIE	177
8. SUMMARY	181
9. PIŚMIENNICTWO.....	185
Publikacje składające się na rozprawę doktorską	229
Oświadczenia współautorów o ich udziale w artykułach stanowiących cykl publikacji składających się na rozprawę doktorską	231
Oświadczenia współautorów – Praca I	233
Oświadczenia współautorów – Praca II	249
Oświadczenia współautorów – Praca III.....	265
Oświadczenia współautorów – Praca IV	283
Oświadczenia współautorów – Praca V	299

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Prace oryginalne:

1. **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: **Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens.** Poultry Science 2023, 102(9), 102823. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>
(Punkty MNiSW₂₀₂₃ 140, IF₂₀₂₃ = 3.8)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

2. **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiak, A.: **Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks.** Antioxidants (Basel) 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>
(Punkty MEN₂₀₂₃ 140, IF₂₀₂₃ = 6.0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i określenie celu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł.S., Michalak, K., Marek, A., Grądzki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: **Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research.** *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>
(Punkty MEN₂₀₂₄ 70, IF₂₀₂₄ = 3.0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i określenie celu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych – analizy poziomu cynku, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4. **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A.: **Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens.** *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>
(Punkty MEN₂₀₂₄ 140, IF₂₀₂₄ = 1.9)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, celu i planu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

5. **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł.S., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiak, A.: **Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered *in ovo*, on immune response in newly hatched chicks.** *Frontiers in Physiology* 2025, 16, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>
(Punkty MEN₂₀₂₅ 100, IF₂₀₂₅ = 3.4)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Łączna punktacja 5 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi:

- wg listy czasopism punktowanych MNiSW/MEN – **pkt. 590**
- sumaryczny Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR) – **18.10**

Fotokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie prac zostały zamieszczone w załączniku.

**Dane bibliograficzne cyklu publikacji składających się na rozprawę
doktorską oraz autora prac**

Lek wet. Artur Ciszewski

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2026

Cytowania dla wybranych publikacji indeksowanych w bazie Web of Science

Autorzy	Tytuł artykułu	Czasopismo	Rok, numer, strony, DOI	Punkty MNIW	Aktualny IF	Liczba cytowań bez autocytowań
ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ S. JAROSZ, ZBIGNIEW GRĄDZKI, AGNIESZKA MAREK, BEATA KACZMAREK, MARCIN HEJDYSZ, ANNA RYSIAK.	Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks	Frontiers in Physiology	2025 Volume 16 Article number: 1646143 DOI: 10.3389/fphys.2025.1646143	100,00	3,400	0
CISZEWSKI ARTUR, JAROSZ ŁUKASZ, GRĄDZKI ZBIGNIEW, MAREK AGNIESZKA, KACZMAREK SEBASTIAN, KWIECIEŃ MAŁGORZATA, RYSIAK ANNA.	Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly- hatched chickens	Livestock Science	2024, Vol. 289 Article number: 105577 DOI: 10.1016/j.livsci.2024.105577	140,00	1,900	11

CISZEWSKI ARTUR, JAROSZ ŁUKASZ, MICHALAK KATARZYNA, MAREK AGNIESZKA, GRĄDZKI ZBIGNIEW, WAWRZYKOWSKI JACEK, SZYMCZAK BARTŁOMIEJ, RYSIK ANNA,	Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after In ovo stimulation with a multi- strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research.	Current Issues in Molecular Biology	2024 Vol. 46 Issue 2 s. 1259-1280 DOI: 10.3390/cimb46020080	70,00	3,000	1
CISZEWSKI ARTUR, ŁUKASZ JAROSZ, MAREK AGNIESZKA, MICHALAK KATARZYNA, ZBIGNIEW GRĄDZKI, BEATA KACZMAREK, ANNA RYSIK	Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens.	Poultry Science	2023 Vol. 102 Iss. 9 Article number: 102823 DOI: 10.1016/j.psj.2023.102823	140,00	3,800	6



CISZEWSKI ARTUR, JAROSZ ŁUKASZ, BIELECKA ARLETTA, MAREK AGNIESZKA, SZYMCZAK BARTŁOMIEJ, GRĄDZKI ZBIGNIEW, RYŚIAK ANNA,	Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks.	Antioxidants	2023. Vol. 12 ks. 11 Article number: 1905 DOI: 10.3390/antiox12111905	140,00	6,000	3


 BIBLIOTEKA GŁÓWNA
 WYDZIAŁ INŻYNIERII I TECHNOLOGII
 ul. Akademicka 25, 20-030 Lublin, PL
 tel. (+48 81) 445 64 22, 445 64 23, 445 64 24, 445 64 25, 445 64 26, 445 64 27, 445 64 28, 445 64 29, 445 64 30, 445 64 31, 445 64 32, 445 64 33, 445 64 34, 445 64 35, 445 64 36, 445 64 37, 445 64 38, 445 64 39, 445 64 40, 445 64 41, 445 64 42, 445 64 43, 445 64 44, 445 64 45, 445 64 46, 445 64 47, 445 64 48, 445 64 49, 445 64 50, 445 64 51, 445 64 52, 445 64 53, 445 64 54, 445 64 55, 445 64 56, 445 64 57, 445 64 58, 445 64 59, 445 64 60, 445 64 61, 445 64 62, 445 64 63, 445 64 64, 445 64 65, 445 64 66, 445 64 67, 445 64 68, 445 64 69, 445 64 70, 445 64 71, 445 64 72, 445 64 73, 445 64 74, 445 64 75, 445 64 76, 445 64 77, 445 64 78, 445 64 79, 445 64 80, 445 64 81, 445 64 82, 445 64 83, 445 64 84, 445 64 85, 445 64 86, 445 64 87, 445 64 88, 445 64 89, 445 64 90, 445 64 91, 445 64 92, 445 64 93, 445 64 94, 445 64 95, 445 64 96, 445 64 97, 445 64 98, 445 64 99, 445 64 100



Biblioteka Główna UP w Lublinie

Bibliografia Publikacji Pracowników Uniwersytetu Przyrodniczego

Raport autora – Ciszewski Artur

1. Publikacje w czasopismach naukowych

1.1. Publikacje w czasopiśmie naukowym posiadającym Impact Factor IF

Lp	Opis bibliograficzny	IF	Pkt. MNISW
1.	Effect of SSR504734, a Selective Glycine Transporter Type 1 Inhibitor, on Seizure Thresholds, Neurotransmitter Levels, and Inflammatory Markers in Mice. [AUT.] NIKOLA GAPIŃSKA, PIOTR WŁAŻ, ELZBIETA WYSKA, ARTUR ŚWIERCZEK, KRZYSZTOF KAMIŃSKI, MARCIN JAKUBIEC, MICHAŁ ABRAM, KATARZYNA CIEPIELA, GNIEWOMIR LATA CZ, TYMOTEUSZ SŁOWIK, DAWID KROKOWSKI, ŁUKASZ JAROSZ, ARTUR CISZEWSKI, [AUT. KORESP.] KATARZYNA SOCAŁA, <i>ACS Chem. Neurosci.</i> 2025 Vol 16 Issue 6 s. 1210-1226, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1021/acscchemneuro.5c00039	3,900	100,00
2.	Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, [AUT. KORESP.] ŁUKASZ S. JAROSZ, [AUT.] ZBIGNIEW GRĄDZKI, AGNIESZKA MAREK, BEATA KACZMAREK, MARCIN HEJDYSZ, ANNA RYSIAK. <i>Front. Physiol</i> 2025 Volume 16 Article number 1646143, il., bibliogr. sum. DOI: 10.3389/fphys.2025.1646143	3,400	100,00
3.	Subacute exposure to apigenin induces changes in protein synthesis in the liver of Swiss mice. [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] KATARZYNA SOCAŁA, KATARZYNA MICHALAK, KAMILA BULAK, ARTUR CISZEWSKI, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI, PIOTR WŁAŻ, EDYTA KÓWALCZUK-VASILEV, ANNA RYSIAK. <i>Front. Physiol</i> 2025 Volume 16 Article number 1576310, il., bibliogr. sum. DOI: 10.3389/fphys.2025.1576310	3,400	100,00



Lp	Opis bibliograficzny	IF	Pkt. MNIŚW
4	Effect of <i>in ovo</i> feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. [AUT.] CISZEWSKI ARTUR, [AUT. KORESP.] JAROSZ ŁUKASZ, [AUT.] GRĄDZKI ZBIGNIEW, MAREK AGNIESZKA, KACZMAREK SEBASTIAN, KWIECIEŃ MAŁGORZATA, RYSIAK ANNA. <i>Livest. Sci. (Print)</i> 2024 Vol. 189 Article number: 105577, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1016/j.livsci.2024.105577	1,900	140,00
5	Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after <i>In ovo</i> stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. [AUT.] CISZEWSKI ARTUR, [AUT. KORESP.] JAROSZ ŁUKASZ, [AUT.] MICHALAK KATARZYNA, MAREK AGNIESZKA, GRĄDZKI ZBIGNIEW, WAWRZYKOWSKI JACEK, SZYMCHAK BARTŁOMIEJ, RYSIAK ANNA. <i>Curr. Issues Mol. Biol.</i> 2024 Vol. 46 Issue 2 s. 1259-1280, il., bibliogr., sum. DOI: 10.3390/cimb46020080	3,000	70,00
6	The effect of psychoactive bacteria, <i>Bifidobacterium longum</i> Rosell®-175 and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> JB-1, on brain proteome profiles in mice. [AUT. KORESP.] JAROSZ ŁUKASZ, [AUT.] SOCAŁA KATARZYNA, MICHALAK KATARZYNA, WIATER ADRIAN, CISZEWSKI ARTUR, MAJEWSKA MAŁGORZATA, MAREK AGNIESZKA, GRĄDZKI ZBIGNIEW, WLAŻ PIOTR. <i>Psychopharmacology</i> 2024 Vol 241 Issue 5 s. 925-945, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1007/s00213-023-06519-z	3,300	140,00
7	Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. [AUT.] ZUZANNA WIŚNIEWSKA, KOŁODZIEJSKI PAWEŁ, EWA PRUSZYŃSKA-OSZMAŁEK, KONIECZKA PAWEŁ, KINSNER MISZA, GÓRKA PAWEŁ, JADWIGA FLAGA, KOWALIK KINGA, HEJDYSZ MARCIN, KUBIŚ MARTA, JAROSZ ŁUKASZ, ARTUR CISZEWSKI, [AUT. KORESP.] KACZMAREK SEBASTIAN. <i>Arch. Anim. Nutr.</i> 2023 Vol. 77 Iss. 3 s. 187-204, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1080/1745039X.2023.2202591	2,000	100,00
8	Effect of combined <i>in ovo</i> administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. [AUT.] CISZEWSKI ARTUR, ŁUKASZ JAROSZ, MAREK AGNIESZKA, [AUT. KORESP.] MICHALAK KATARZYNA, [AUT.] ZBIGNIEW GRĄDZKI, BEATA KACZMAREK, ANNA RYSIAK. <i>Poult. Sci. (Print)</i> 2023 Vol. 102 Iss. 9 Article number: 102823, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1016/j.psj.2023.102823	3,800	140,00



Lp	Opis bibliograficzny	IE	Pkt. MNISW
9.	Effect of emulsifier and multicarbohydase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. [AUT.] ZUZANNA WIŚNIEWSKA, PAWEŁ KOŁODZIEJSKI, EWA PRUSZYŃSKA, PAWEŁ KONIECZKA, MISZA KINSNER, PAWEŁ GÓRKA, JADWIGA FLAGA, KINGA KOWALIK, MARCIN HEJDYSZ, MARTA KUBIŚ, ŁUKASZ JAROSZ, ARTUR CISZEWSKI, [AUT. KORESP.] SEBASTIAN KACZMAREK. <i>Poویت. Sci (Print)</i> 2023 Vol. 102 Issue 1 Article number 102268, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1016/j.psj.2022.102268	3,800	140,00
10.	Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. [AUT.] CISZEWSKI ARTUR, [AUT. KORESP.] JAROSZ ŁUKASZ, [AUT.] BIELECKA ARLETTA, MAREK AGNIESZKA, SZYM CZAK BARTŁOMIEJ, GRĄDZKI ZBIGNIEW, RYSIAK ANNA. <i>Antioxidants</i> 2023 Vol. 12 Iss. 11 Article number 1905, il., bibliogr., sum. DOI: 10.3390/antiox12111905	6,000	140,00
11.	Evaluation of the effectiveness of alternative methods for controlling coccidiosis in broiler chickens: a field trial. [AUT. KORESP.] SEBASTIAN NOWACZEWSKI, [AUT.] JANISZEWSKI SEBASTIAN, KACZMAREK SEBASTIAN, KACZOR NATALIA, RACEWICZ PRZEMYSŁAW, JAROSZ ŁUKASZ, ARTUR CISZEWSKI, PIOTR ŚŁÓSZARZ, HEJDYSZ MARCIN. <i>Anim. Sci. Pap. Rep.</i> 2023 Vol. 43 Issue 2 s. 97-110, il., bibliogr., sum. DOI: 10.2478/aspr-2023-0001	0,900	100,00
12.	The effect of glutamine as feed additive on selected parameters of the nonspecific immune response in pigs. [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] EWA TOMASZEWSKA, AGNIESZKA MAREK, MARCIN HEJDYSZ, ARTUR BURMAŃCZUK, ARTUR CISZEWSKI, SEBASTIAN NOWACZEWSKI, ZBIGNIEW GRĄDZKI, MACIEJ BATORSKI, MAŁGORZATA ŚWIĄTKIEWICZ, ANNA RYSIAK. <i>Agriculture</i> 2023 Vol. 13 Issue 4 Article number: 912, il., bibliogr., sum. DOI: 10.3390/agriculture13040912	3,300	140,00
13.	The effect of reduction of resistant starch content of faba bean and pea by amylase supplementation on performance, nutrient digestibility, and sialic acid excretion of broiler chickens. [AUT.] K. PERZ, S. KACZMAREK, S. NOWACZEWSKI, A.J. COWIESON, Ł. JAROSZ, A. CISZEWSKI, [AUT. KORESP.] M. HEJDYSZ. <i>Anim. Feed Sci. Technol. (Print)</i> 2023 Vol. 298 Article number: 115621, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2023.115621	2,500	200,00



Lp	Opis bibliograficzny	IE	Pkt. MNISW
14	The Effect of Supplementation with β -Hydroxy- β -Methylbutyric Acid (HMB) to Pregnant Sows on the Mucosal Structure, Immunolocalization of Intestinal Barrier Proteins, VIP and Leptin in the Large Intestine in their Offspring. [AUT. KORESP.] EWA TOMASZEWSKA, [AUT.] PIOTR DOBROWOLSKI, ŁUKASZ PROST, DEEPESH K. P. CHAND, JANINE DONALDSON, DAGMARA WINIARCZYK, ŁUKASZ JAROSZ, ARTUR CISZEWSKI, ANNA CZECH, SIEMOWIT MUSZYŃSKI. <i>Ann. Anim. Sci.</i> 2023 Vol. 23 Iss. 1 s. 87-96, il., bibliogr. sum. DOI: 10.2478/2023-0079	1,800	200,00
15	Xanthoma in different species – an unusual tumor with many faces. [AUT.] ŚOBCZYŃSKA-RAK ALEKSANDRA, [AUT. KORESP.] ŻYLIŃSKA BEATA, [AUT.] JAROSZ ŁUKASZ, CISZEWSKI ARTUR, KACZMAREK BEATA. <i>Med. Weter.</i> 2023 Vol. 79 nr 8 s. 388-393, il., bibliogr., sum. DOI: 10.21521/mw.6803	0,400	70,00
16	Effect of weight and storage time of broiler breeders' eggs on morphology and biochemical features of eggs, embryogenesis, hatchability, and chick quality. [AUT.] SEBASTIAN NOWACZEWSKI, M. BABUSZKIEWICZ, TOMASZ SZABLEWSKI, K. STUPER-SZABLEWSKA, R. CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, Ł. TOMCZYK, S. KACZMAREK, A. SECHMAN, M. W. LIS, M. KWAŚNIEWSKA, P. RACEWICZ, Ł. JAROSZ, A. CISZEWSKI, T. NOWAK, [AUT. KORESP.] M. HEJDYSZ. <i>Animal</i> 2022 Vol. 16 Issue 7 Abstract number 100564, il., bibliogr. sum. DOI: 10.1016/j.animal.2022.100564	3,600	200,00
17	Effects of low crude protein content and glycine supplementation on broiler chicken performance, carcass traits, and litter quality. [AUT. KORESP.] MARCIN HEJDYSZ, [AUT.] JOANNA BOGUŁKA, EWA ZIOŁKOWSKA, KATARZYNA PERZ, ŁUKASZ JAROSZ, ARTUR CISZEWSKI, SEBASTIAN NOWACZEWSKI, PIOTR ŚŁÓSZARZ, SEBASTIAN KACZMAREK. <i>Livest. Sci. (Print)</i> 2022 Vol. 262 Article number 104930, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1016/j.livsci.2022.104930	1,800	140,00
18	Influence of effective microorganisms and clinoptilolite on gut barrier function, intestinal health and performance of broiler chickens during Induced <i>Eimeria tenella</i> infection. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] MARCIN KALINOWSKI, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRADZKI, SEBASTIAN GRABOWSKI, MARCIN HEJDYSZ, SEBASTIAN NOWACZEWSKI, ANNA RYSIAK. <i>Agriculture</i> 2022 Vol. 12 Issue 12 Article number 2176, il., bibliogr., sum. DOI: 10.3390/agriculture12122176	3,600	100,00



Lp	Opis bibliograficzny	IE	Pkt. MNISW
19.	The Effect of feed supplementation with EM Bokashi® multimicrobial probiotic preparation on selected parameters of sow colostrum and milk as indicators of the specific and nonspecific immune response. [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI, BEATA KACZMAREK, ANNA RYSIAK. <i>Probiotics and Antimicrobial Proteins</i> 2022 Vol. 14(6) s. 1029-1041, il., bibliogr. DOI: 10.1007/s12602-021-09850-z	4,900	70,00
20.	The effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulphate on hepatic proteome profiles in chickens. [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] KATARZYNA MICHALAK, AGNIESZKA MAREK, MARCIN HEJDYSZ, ARTUR CISZEWSKI, SEBASTIAN KACZMAREK, MAŁGORZATA KWIECIEŃ, ZBIGNIEW GRĄDZKI. <i>Livest. Sci. (Print)</i> 2022 Vol. 262 Article number 104983, il., bibliogr., sum. DOI: 10.1016/j.livsci.2022.104983	1,800	140,00
21.	The effect of the multi-strain probiotic preparation EM Bokashi® on selected parameters of the cellular immune response in pigs. [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, AGNIESZKA MAREK, MARCIN HEJDYSZ, SEBASTIAN NOWACZEWSKI, ZBIGNIEW GRĄDZKI, KATARZYNA MICHALAK, MAŁGORZATA KWIECIEŃ, ANNA RYSIAK. <i>Food Agric. Immunol</i> 2022 Vol. 33 Iss. 1 s. 167-191. DOI: 10.1080/09540105.2021.2006611	3,000	100,00
22.	The effect of feed supplementation with a copper-glycine chelate and copper sulphate on cellular and humoral immune parameters in chickens. [AUT. KORESP.] ŁUKASZ JAROSZ, [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, SEBASTIAN GRABOWSKI, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI, BEATA ŻYLIŃSKA, ANNA RYSIAK. <i>Food Agric. Immunol</i> 2021 Vol. 32 Iss. 1 s. 373-402. DOI: 10.1080/09540105.2021.1954143	3,268	100,00
Suma:		65,368	2730,00

1.2 Publikacja w czasopiśmie naukowym nieposiadającym IF

Lp	Opis bibliograficzny	Pkt. MNISW
1.	Mykobakteriozy ptaków, cz. I. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ JAROSZ, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI. <i>Pol. Drobniar.</i> 2022 nr 5 s. 46-51, il.	5,00
2.	Mykobakteriozy ptaków, cz. II. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ JAROSZ, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI. <i>Pol. Drobniar.</i> 2022 nr 6 s. 10-13, il.	5,00
3.	Mykobakteriozy ptaków, cz. III. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ JAROSZ,	5,00



Lp	Opis bibliograficzny	Pkt. MNISW
	AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI. <i>Pol. Drobniar</i> . 2022 nr 7 s. 10-13, il.	
4.	Mykobakteriozy ptaków, cz. IV. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ JAROSZ, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI. <i>Pol. Drobniar</i> . 2022 nr 8 s. 20-22, il.	5,00
5.	Badanie serologiczne w kierunku kaliciwirozy i herpeswirozy kotów pochodzących z różnych środowisk (The use of serologic tests in the diagnosis of feline calicivirus and herpesvirus in cats vaccinated and non-vaccinated against those diseases). [AUT.] ADASZEK ŁUKASZ, CISZEWSKI ARTUR, LACHOWICZ KATARZYNA, PAULINA NIEDBAŁA, PIŚAREK MARIA, JACKOWSKA-PEJKO NATALIA. <i>Weter. Prakt.</i> 2021 Vol.18 Issue 4 s. 48-52, il., bibliogr., streszcz.	5,00
6.	Możliwości wykorzystywania probiotyków opartych na żywych kulturach mikroorganizmów w produkcji drobiarskiej. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ JAROSZ, AGNIESZKA MAREK, ZBIGNIEW GRĄDZKI. <i>Pol. Drobniar</i> . 2021 Supplement Zdrowie s. 88-94, il.	5,00
7.	Poziom przeciwciał u kotów i psów szczepionych i nieszczepionych przeciwko panleukopenii i parwowirozie (Evaluation of antibody titres in cats and dogs vaccinated and non-vaccinated against panleukopenia and parvovirus). [AUT.] ADASZEK ŁUKASZ, WÓJCIK ALICJA, NIEDBAŁA PAULINA, PIŚAREK MARIA, CISZEWSKI ARTUR, JACKOWSKA-PEJKO NATALIA, WINIARCZYK STANISŁAW. <i>Życie Wet.</i> 2021 Vol. 96 nr 5 s. 332-336, il., bibliogr., sum.	5,00
	Suma:	35,00

2. Inne

2.1. Materiały konferencyjne

Lp Opis bibliograficzny

1. Impact of phytobiotics on oxidative-antioxidative status in laying hens: A comparative study. [AUT.] SZYMCHAK B., CISZEWSKI A., JAROSZ Ł., WÓJCIK M., W: International Scientific Conference "Human - Animal - Environment - our health, common health". Book of Abstracts. Lublin, October 11-12 2024 s. 80. Lublin 2024, [Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie].
2. Mannheimia haemolytica – a recurrent problem in lamb breeding – case report. [AUT.] CISZEWSKI ARTUR, JAROSZ ŁUKASZ, ŚMIECH ANNA, NOWAKIEWICZ ANETA, GRĄDZKI ZBIGNIEW. W: 3rd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT, 24 April 2024 Abstract number: A006. Lublin 2024, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. DOI: 10.24326/ICDSUPL3.A006



Lp Opis bibliograficzny

3. Wpływ suplementacji in ovo probiotyku wieloszczepowego i/lub chelatu glicynowego cynku na stężenie cytokin, białek ostrej fazy i immunoglobulin w surowicy i tkankach nowo wyklućcych piskląt (Effect of in ovo supplementation with a multi-strain probiotic and/or zinc glycine chelate on the concentration of cytokines, acute phase proteins and immunoglobulins in serum and tissues of newly hatched chicks). [AUT.] CISZEWSKI ARTUR, JAROSZ ŁUKASZ, MAREK AGNIESZKA, GRĄDZKI ZBIGNIEW, RYSIAK ANNA. W: XVII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Sanitas Animalium Pro Salute Homini, Materiały Konferencyjne, Olsztyn, 19-21.09.2024 r. s. 250. Olsztyn 2024; [Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie].
4. Hemorrhagic enterotoxemia of lambs – still a valid problem in sheep breeding. [AUT., KORESP.] CISZEWSKI ARTUR, [AUT.] BATORSKI MACIEJ, JAROSZ ŁUKASZ, ŁOPUSZYŃSKI WOJCIECH, GRĄDZKI ZBIGNIEW. W: 2nd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT, 19 April 2023 Abstract number: A003. Lublin 2023, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. DOI: 10.24326/ICDSUPL1.A003
5. Hepatic oxidative stress in poultry exposed to different doses of lupin (*L. angustifolius*). [AUT.] SZYMCHAK B., CISZEWSKI A., DELLA CROCE, LONGO V., JAROSZ Ł., WÓJCIK M. J. *Physiol. Pharmacol.* 2023 Vol. 74 Supp. 2 - 29th Congress of The Polish Physiological Society, September 21-23, 2023 Łódź, Poland - Book of Programme and Abstracts s. 74.
6. Effect of the multi-strain probiotic formulation Bokashi and clinoptilolite on gut barrier function, intestinal health, and performance of broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. [AUT., KORESP.] CISZEWSKI ARTUR, [AUT.] JAROSZ ŁUKASZ, GRĄDZKI ZBIGNIEW, KALINOWSKI MARCIN. W: 1st International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT Abstract number A004. Lublin 2022, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. DOI: 10.24326/ICDSUPL1.A004
7. Multifocal hepatic abscesses due to *Trueperella pyogenes* in lambs. [AUT.] ARTUR CISZEWSKI, ŁUKASZ JAROSZ, WOJCIECH ŁOPUSZYŃSKI, DOROTA PIETRAS-OZGA, ZBIGNIEW GRĄDZKI. W: 1st International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT Abstract number A035. Lublin 2022, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. DOI: 10.24326/ICDSUPL1.A035



Sumaryczny IF – 65,368
Sumaryczna liczba punktów MNiSW – 2765,00

Szczegółowe wyjaśnienia:

- Wskaźnik Impact Factor został podany na podstawie bazy Journal Citation Reports (JCR) dla roku wydania publikacji, z wyjątkiem publikacji z roku 2025, gdzie jego wartość została podana na podstawie ostatniej edycji JCR ed. 2024
- Punktacja została podana na podstawie Wykazu Czasopism Punktowanych MNiSW obowiązujących dla roku wydania publikacji z wyjątkiem:
 - publikacji z roku 2021-2022 którym punkty zostały przypisane na podstawie: „Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 22 grudnia 2021 r. o zmianie i sprostowaniu komunikatu w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych”




Wykaz sporządziła
mgr inż. Anna Gawryluk



Lublin, 06.10.2025 r.

Zestawienie wyników cytowań sporządzone przez pracownika Oddziału Informacji Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (wg kwerendy na dzień 06.10.2025) dla lek. wet. Artura Ciszewskiego

Według bazy Web of Science Core Collection – Basic Search	
Liczba prac indeksowanych w bazie	21
Liczba cytowań opublikowanych prac	88
Liczba cytowań opublikowanych prac bez autocytowań	84
Liczba artykułów cytujących	85
Liczba artykułów cytujących bez autocytowań	82
Średnia liczba cytowań na pozycję	4,19
Indeks Hirscha	6
Według bazy Scopus	
Liczba prac indeksowanych w bazie	21
Liczba cytowań opublikowanych prac	90
Liczba cytowań opublikowanych prac bez autocytowań	86
Indeks Hirscha	7



Anna Gawryluk

Wykaz sporządziła
mgr inż. Anna Gawryluk

WYKAZ SKRÓTÓW

1-D SDS-PAGE	jednowymiarowa elektroforeza żelowa SDS-PAGE	one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis
ACN	acetonitryl	acetonitrile
AGF	alfa-1 kwaśna glikoproteina	alpha-1-acid glycoprotein
AGP	antybiotyczne stymulatory wzrostu	antibiotic growth promoters
AI	wskaźnik aterogenności, wskaźnik miażdżycowy	atherogenic index
ALAT	aminotransferaza alaninowa	alanine aminotransferase
AMY	amylaza	amylase
APP	białka ostrej fazy	acute phase proteins
APR	odpowiedź ostrej fazy	acute phase response
ASPAT	aminotransferaza asparaginianowa	aspartate aminotransferase
ATP	adenozynotrifosforan	adenosine triphosphate
BIL D	bilirubina bezpośrednia	direct bilirubin
BIL T	bilirubina całkowita	total bilirubin
BILE ACID	kwasy żółciowe	bile acid
Bu-1a ⁺	komórki wykazujące ekspresję markera powierzchniowego Bu-1A	cells expressing the Bu-1A surface marker
BWG	przyrosty masy ciała	body weight gain
C12:0	kwasy laurynowy	lauric acid
C14:0	kwasy mirystynowy	myristic acid
C16:0	kwasy palmitynowy	palmitic acid
C16:1	kwasy oleopalmitynowy	palmitoleic acid
C18:0	kwasy stearynowy	stearic acid
C18:1n9c	kwasy oleinowy	oleic acid
C18:2n6c	kwasy linolowy	linoleic acid

C ₄ H ₈ O ₂	kwas masłowy	butyric acid
CAD	choroba niedokrwienna serca	coronary artery disease
CAT	katalaza	catalase
CD	cząsteczki powierzchniowe	surface molecules s. cluster of differentiation
CFU	jednostka tworząca kolonię	colony forming unit
CHOL	cholesterol	cholesterol
CP	ceruloplazmina	ceruloplasmin
CpG	cytozyna–fosforan–guanina	cytosine–phosphate–guanine
Cu/Zn SOD-1	dysmutaza ponadtlenkowa zależna od cynku i miedzi	copper-zinc superoxide dismutase
DEPPD	N,N-dietylo-p-fenylendiamina	N,N-diethyl-p-phenylenediamine
DFA	kwasy tłuszczowe korzystne dla zdrowia	desirable fatty acids
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy	deoxyribonucleic acid
DOH	dzień wylęgu	day on hatch
DOI	dzień inkubacji	day of incubation
EAA	aminokwasy egzogenne	essential amino acids
ED	dzień embrionalny	embryonic day
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu	epidermal growth factor
EM	efektywne mikroorganizmy	effective microorganisms
FA	kwasy tłuszczowe	fatty acids
FAAS	płomieniowa absorpcyjna spektrometria atomowa	flame atomic absorption spectrometry
FCR	współczynnik konwersji paszy	feed conversion ratio
FI	spożycie paszy	feed intake
FITC	izotiocyanian fluoresceiny	fluorescein isothiocyanate

FMRF	tetrapeptyd Phe–Met–Arg–Phe–NH ₂ , amidopodobny neuropeptyd z rodziny FMRFamide-like peptides	phenylalanyl–methionyl–arginyl– phenylalaninamide, amide-like neu- ropeptide of the FMRFamide family
GALT	tkanka limfatyczna związana z jelitami	gut-associated lymphoid tissue
Gamma- ECS	syntetaza gamma-glutamylcysteinowa/ ligaza glutaminianowo-cysteinowa	gamma-glutamylcysteine synthetase/glutamate-cysteine ligase
GGT	gamma-glutamylotranspeptydaza	gamma-glutamyltransferase
GPX	peroksydaza glutationowa	glutathione peroxidase
Glu	kwask glutaminowy	glutamic acid
GSH	glutation	glutathione
h/H	stosunek kwasów tłuszczowych hipocholesterolemiczny/hipercholeste- rolemiczny	hypcholesterolaemic/hypercholeste- rolaemic ratio
HCCA	kwask α-cyano-4-hydroksycynamonowy	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
HDL D	lipoproteiny o dużej gęstości, frakcja bezpośrednia	high-density lipoproteins – direct fraction
HFA	kwasy tłuszczowe hipercholesterole- miczne	hypercholesterolemic fatty acids
Hp	haptoglobina	haptoglobin
HPA	oś przysadka-podwzgórze-nadnercza	hypothalamic–pituitary–adrenal axis
Hsp 70	białko szoku cieplnego 70	heat shock protein 70
HU	jednostka Haugha	Haugh unit
IBV virus	wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli	infectious bronchitis virus
IFN-γ	interferon gamma	interferon gamma
Ig	immunoglobulina	immunoglobulin
ILE	limfocyty śródnabłonkowe jelita	intestinal intraepithelial lymphocytes
ILT	zakaźne zapalenie krtani i tchawicy	infectious laryngotracheitis
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu	inducible nitric oxide synthase

KLH	hemocyjanina z małża morskiego <i>Megathura crenulata</i>	keyhole limpet hemocyanin from <i>Megathura crenulata</i>
KUL01 ⁺	komórki wykazujące ekspresję markera powierzchniowego KUL01	cells expressing the KUL01 surface marker
LAB	bakterie fermentacji mlekowej	lactic acid bacteria
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas tandemową	liquid chromatography–tandem mass spectrometry
LDH	dehydrogenaza mleczanowa	lactate dehydrogenase
LDL D	lipoproteiny o małej gęstości, frakcja bezpośrednia	low-density lipoproteins – direct fraction
LIPASE	lipaza	lipase
LPLRF	pentapeptyd Leu–Pro–Leu–Arg–Phe–NH ₂ , amidopodobny neuropeptyd z rodziny FMRFamide-like peptides	leucyl–prolyl–leucyl–arginyl–phenylalaninamide, amide-like neuropeptide of the FMRFamide family
Lys	lizyna	lysine
m/z	stosunek masy cząsteczki do ładunku wytworzonego jonu	mass-to-charge ratio
MALDI	desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą	matrix-assisted laser desorption/ionization
MALDI-TOF MS	spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą i pomiarem czasu przelotu jonów	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MALT	tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi	mucosa-associated lymphoid tissue
MBL	lektyna wiążąca mannozę	mannose-binding lectin
Met	metionina	methionine
MDA	dialdehyd malonowy	malondialdehyde
MHC II	komórki głównego układu zgodności tkankowej klasy II	major histocompatibility complex class II cells
MnSOD	dysmutaza ponadtlenkowa manganowa	manganese superoxide dismutase

MQ water	woda ultra czysta	ultrapure water
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy	matrix ribonucleic acid
MS	spektrometria mas	mass spectrometry
MT	metalotioneiny	metallothionein
MUFA	jednonienasycone kwasy tłuszczowe	monounsaturated fatty acids
n-3	rodzina kwasów tłuszczowych omega-3	omega-3 fatty acids family
n-6	rodzina kwasów tłuszczowych omega-6	omega-6 fatty acids family
NF-κB	czynnik jądrowy kappa B	nuclear factor kappa B
NK	limfocyty NK	lymphocytes natural killer
NK2 ho- meobox 3	białko różnicowania naskórka	epidermal differentiation protein
NKT	nienasycone kwasy tłuszczowe	unsaturated fatty acids
NOS	syntetaza tlenku azotu	nitric oxide synthase
NRF2	czynnik jądrowy erytroidalny 2	nuclear factor erythroid 2
PBMC	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej	peripheral blood mononuclear cel
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	polymerase chain re action
PRH	prolaktoliberyna	prolactin releasing hormone
PSA-II	izoenzym aminopeptydazy wrażliwej na puromycynę	puromycin-sensitive aminopeptidase isozyme II
PSP	fosfataza serynowo-treoninowa	protein-serine/threonine phosphatase
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe	polyunsaturated fatty acids
qRT-PCR	ilościowa odwrotna transkrypcja połą- czona z reakcją łańcuchową polimerazy	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RH	wilgotność względna	relative humidity
ROS	reaktywne formy tlenu	reactive oxygen species
RPE	fikoerytryna	phycoerythrin

S/P	wskaźnik nasycenia (stosunek nasyconych do nienasyconych kwasów tłuszczowych)	saturation index (ratio of saturated to unsaturated fatty acids)
SAA	surowiczy składnik amyloidu A	serum amyloid A
SCD-1	desaturaza stearoilo-CoA ($\Delta 9$ -desaturaza)	stearoyl-CoA desaturase ($\Delta 9$ -desaturase)
SCFA	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe	short-chain fatty acids
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodecylsiarczanem sodu	sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis
SFA	nasycone kwasy tłuszczowe	saturated fatty acids
SG	serglycyna	serglycin
SGLT1	kotransporter sodowo-glukozowy typu 1	sodium-glucose cotransporter 1
SH	grupy sulfhydrylowe	sulfhydryl groups
SMLCs	jednojądrzaste komórki śledziony	spleen mononuclear cells
SRBC	baranie krwinki czerwone	sheep red blood cells
T-AOC	całkowita pojemność antyoksydacyjna	total antioxidant capacity
TBA	kwas tiobarbiturowy	thiobarbituric acid
TCR $\gamma\delta^+$	receptor limfocytów T $\gamma\delta^+$	gamma delta T-cell receptor
TFA	kwas trifluorooctowy	trifluoroacetic acid
TG	triglicerydy	triglycerides
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu beta	transforming growth factor beta
Th1/Th2	limfocyty T pomocnicze typu 1 i typu 2	T helper type 1 and T helper type 2 cells
TI	wskaźnik trombogenności	thrombogenic index
TLR	receptor Toll-podobny	Toll-like receptor
TNF α	czynnik martwicy nowotworów alfa	tumor necrosis factor alpha
TOF	czasu przelotu (jonów)	time-of-Flight (ion)
TP	białko całkowite	total protein

TPTZ	2,4,6-tri-pirydylo-striazyna	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
Treg	limfocyty T regulatorowe	regulatory T cells
TTR	transtyretyna	transthyretin
UFA	nienasycone kwasy tłuszczowe	unsaturated fatty acids
V-ATP azy	podjednostki białka ATP-azy typu V	V-type proton ATPase subunit
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczynio- wego	vascular endothelial growth factor
VLDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości	very low-density lipoproteins
Zn	cynk	zinc
Zn-Gly	chelat glicynowy cynku	zinc–glycine chelate
ZnONPs	nanocząstki tlenku cynku	zinc oxide nanoparticles
α -1-AGP	alfa-1 kwaśna glikoproteina	alpha-1-acid glycoprotein
Σ	suma	sum

1. WSTĘP

1.1. Wyzwania współczesnej produkcji drobiarskiej

Współczesna produkcja drobiu, oparta na zasadach zrównoważonego rozwoju, dąży do pozyskiwania jak największej ilości mięsa drobiowego przy jednoczesnym zapewnieniu bezpieczeństwa produktów spożywczych poprzez dbałość o wskaźniki zdrowotne i hodowlane ptaków (Hafez i Attia, 2020). Nowoczesne systemy chowu i hodowli drobiu ukierunkowane są na doskonalenie genetycznych cech produkcyjnych, sprzyjających skróceniu czasu tuczu brojlerów, uzyskiwaniu wyższych przyrostów masy ciała, poprawie jakości pozyskiwanego mięsa i zwiększeniu rentowności ferm dzięki obniżeniu współczynnika konwersji paszy (FCR, feed conversion ratio) (Lukić i in., 2022; Olejnik i in., 2022). Rosnące zapotrzebowanie na drobiowe produkty spożywcze o pozytywnych walorach żywieniowych i dietetycznych wymusza opracowywanie nowych technologii pozyskiwania kurcząt i ich hodowli (Mottet i Tempio, 2017). Stosowane w tym celu manipulacje genetyczne, zmierzające do selekcji linii drobiu o wysokiej mięsności, w połączeniu z nowoczesnymi systemami zarządzania produkcją i racjonalnym żywieniem umożliwiają producentom uzyskiwanie w krótkim czasie pożądanej wagi ubojowej kurcząt i stanowią fundament rentowności hodowli (Hartcher i Lum, 2019; Choi i in., 2023).

Intensyfikacja produkcji drobiu, dokonywana poprzez rozwijanie hodowli wysoko wydajnych kurcząt brojlerów niesie za sobą także liczne negatywne konsekwencje, tak dla ptaków jak i środowiska hodowlanego (Olejnik i in., 2022; Grżinić i in., 2023). W takich warunkach dochodzi m.in. do obniżenia odporności ptaków na patogeny środowiskowe, występowania chorób zakaźnych i niezakaźnych, zwiększonej śmiertelności kurcząt, a także rozwoju zjawiska lekooporności i zanieczyszczenia produktów zwierzęcych i środowiska pozostałościami środków przeciwdrobnoustrojowych (Mehdi i in., 2018; Abreu i in., 2023; Grżinić i in., 2023). W kontekście wymienionych zagrożeń zasadne jest propagowanie zrównoważonej produkcji drobiarskiej, uwzględniającej wprowadzony w 2006 r. zakaz stosowania w żywieniu antybiotykowych stymulatorów wzrostu (AGP, antibiotic growth promoters) oraz poszukiwanie alternatywnych metod pozyskiwania i hodowli kurcząt brojlerów (Selaledi i in., 2020; Mesquita i in., 2021; Yalcin i in., 2022). Zakłada się, że efektem tych działań będzie zapewnienie bezpieczeństwa żywności i dobrostanu ptaków przy zachowaniu wysokich wskaźników produkcyjnych i równoczesnym zwiększeniu odporności ptaków na choroby.

Przeciwdziałanie niekorzystnym zjawiskom, które mogą prowadzić do nasilenia występowania chorób zakaźnych i metabolicznych, a także różnorodnych zaburzeń odporności ptaków pod wpływem czynników zakaźnych, niezakaźnych i środowiskowych możliwe jest na wielu etapach cyklu hodowlanego. Uzyskiwanie pożądanych efektów produkcyjnych i odpowiedni status zdrowotny ptaków można zapewnić m.in. poprzez produkcję piskląt o korzystnych cechach genetycznych oraz utrzymywanie wysokiego statusu immunologicznego poprzez odpowiednie żywienie w okresie wzrostu i rozwoju (Adedokun i Olojede, 2019; Jha i in., 2019). Krytyczny z punktu widzenia przeżywalności piskląt, która rzutuje na dalszy przebieg odchowu, końcowe wyniki tuczu i rachunek ekonomiczny fermy, jest okres rozwoju zarodkowego i powylęgowy (Nowaczewski i in., 2022; Tona i in., 2022). Odpowiednie warunki rozwoju zarodka zapewniają wysoki współczynnik przeżywalności piskląt w pierwszym okresie po wykluciu, lepsze przyrosty masy ciała i zwiększenie odporności na zakażenia, co w konsekwencji przyczynia się do skrócenia okresu tuczu, a także ograniczenia stosowania antybiotyków w trakcie odchowu (Li i in., 2022; Tona i in., 2022). W okresie zarodkowym zachodzą ponadto liczne, istotne procesy metaboliczne, rzutujące na dalszy rozwój ptaków (De Oliveira i in., 2008).

1.2. Zdrowotność ptaków w okresie zarodkowym i powylęgowym

W przeciwieństwie do ssaków zarodki ptaków są całkowicie zależne od zawartości składników odżywczych w jajach (Givisiez i in., 2020). W trakcie inkubacji metabolizm zarodka zmienia się w zależności od dostępnego substratu energetycznego i dostarczania tlenu. W pierwszym tygodniu rozwoju metabolizm zarodka podtrzymywany jest dzięki zapasom glukozy (Moran, 2007), natomiast po uformowaniu błon pozazarodkowych główny substrat energetyczny stanowią lipidy (De Oliveira i in., 2008; Givisiez i in., 2020). Warto podkreślić, że intensywny rozwój zarodka kurzego oraz zachodzące w tym okresie procesy biologiczne i przemiany metaboliczne prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxygen species) i wolnych rodników (Deeming i Pike, 2013), które odgrywają istotną rolę w podstawowych procesach biologicznych zachodzących w organizmie, tak w stanie zdrowia, jak i choroby (Yang i Lian, 2020). Ich znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu sprowadza się do funkcji przekaźników sygnału oraz regulacji ekspresji genów, procesów naprawczych w komórkach i zjawiska apoptozy (Schieber i Chandel, 2014). Biorą one także udział w licznych procesach metabolicznych, reakcjach redoks w łańcuchu oddechowym i odtwarzaniu związków wysokoenergetycznych (ATP- adenozyntotryfosforan), a także aktywują cytochrom P450 i procesy fagocytozy drobnoustrojów (Murphy i in., 2011). W przypadku zachwiania równowagi pomiędzy

tempem powstawania ROS i wydolnością układu antyoksydacyjnego w organizmie dochodzi do wytworzenia stanu stresu oksydacyjnego, prowadzącego do uszkodzania struktur komórkowych i zaburzenia ich funkcji (Evans i in., 2004; Bartosz, 2009; Poljsak i in., 2013). Niekorzystny wpływ stresu oksydacyjnego wyraża się m.in. oddziaływaniem reaktywnych form tlenu na procesy utleniania białek, lipidów i kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), inaktywacją enzymów i białek transportowych, a także indukowaniem mutacji genetycznych i transformacji nowotworowej (Bartosz, 2009; Murphy i in. 2011; Poljsak i in., 2013; Albano i in., 2022). Rozwijające się zarodki kurze zawierają znaczne ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, polyunsaturated fatty acids) we frakcji lipidowej (Surai i in., 2016), a ich utlenianie w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do zmiany składu, struktury i właściwości błon komórkowych i aktywności enzymów związanych z błonami (Surai, 2002, Surai, 2006). Zjawiska te prowadzą do zwiększenia zamieralności zarodków, upośledzenia wzrostu i rozwoju oraz negatywnego oddziaływania na procesy odpornościowe u ptaków. W ostatniej fazie inkubacji środowisko wewnętrzne zarodka ulega dalszym zmianom, co prowadzi do zmian w metabolizmie (Moran, 2007). W 19 dniu inkubacji, po pęknięciu błony kosmówkowo-omoczniowej, spada dostępność tlenu, w związku z czym wykorzystywanie kwasów tłuszczowych przez zarodek jest nieefektywne i nie pokrywa zapotrzebowania energetycznego (Moran, 2007). W takich warunkach dochodzi do zmian metabolicznych w kierunku beztlenowego katabolizmu glukozy, który zależy od rozpadu zapasów glikogenu zgromadzonego w tkance mięśniowej i wątrobowej, nadzorowanego przez szlak glukoneogenezy (Uni i Ferket, 2004; Givisiez i in, 2020).

Krytyczny dla rozwoju zarodka jest również moment wylęgu i okres powylęgowy, mające znaczący wpływ na dalszy rozwój pisklęcia (Elibol i Brake, 2004; De Oliveira i in., 2008). W tym okresie zachodzą u piskląt istotne zmiany fizjologiczne i metaboliczne, natomiast występujące w tym czasie zaburzenia tych procesów wpływają na przeżycie kurczęcia i jego późniejszą wydajność produkcyjną (Christensen i in., 1999; Collin i in., 2007; Leksrisonpong i in., 2007). Zbyt rozciągnięte w czasie okno wylęgowe, wydłużone do 24-36 godz., skutkuje opóźnieniem dostępu do wody i paszy u wyklutych piskląt, co negatywnie wpływa na ich kondycję (Willemsen i in., 2010; Jha i in., 2019). Taki stan przyczynia się do zwiększonej śmiertelności ptaków i problemów rozwojowych, w tym opóźnionego rozwoju jelit (Geyra i in., 2001), upośledzenia bariery jelitowej i zwiększonej podatności na zakażenia patogenami chorobotwórczymi (Uni i in., 2003a,b). Bar Shira i in. (2005) oraz Taha-Abdelaziz i in. (2018) wykazali, że opóźnienie karmienia piskląt hamuje rozwój narządów limfoidalnych, co wpływa na wielkość subpopulacji limfocytów krwi obwodowej i zaburza procesy humoralnej odpowiedzi układu

odpornościowego, np. po podaniu szczepionek. Ponadto, w tym okresie ma miejsce znaczna redukcja masy ciała piskląt, co w połączeniu z zaburzeniami rozwoju jelit, mięśni i dysfunkcją układu immunologicznego przyczynia się do zwiększenia podatności na zakażenia patogenami środowiskowymi i współczynnika śmiertelności ptaków, wpływając negatywnie na wynik ekonomiczny fermy (Jha i in., 2019; Wickramasuriya i in., 2022). Utrata woreczka żółtkowego i zanik zmagazynowanych zasobów energetycznych po wylęgu sprawiają, że większość skrajnie wygłodzonych piskląt pada w pierwszych 4 dniach życia. Dodatkowo, prowadzone w tym okresie zabiegi technologiczne, takie jak seksowanie piskląt, działają stresogennie, co niekorzystnie wpływa na kondycję ptaków i potencjał ich odporności (Willemssen i in., 2010; Hedlund i in., 2021). Ponadto, pisklęta muszą przystosować się do wykorzystywania substancji odżywczych zawartych w paszy białkowo-węglowodanowej (Uni i in., 2003a), które w dalszym etapie życia są niezbędne do wspierania rozwoju przewodu pokarmowego w aspekcie morfologicznym i fizjologicznym (Uni i Ferket, 2004; Givisiez i in., 2020).

1.3. Technologia in ovo jako narzędzie wczesnej immunomodulacji

W celu intensyfikacji procesów antyoksydacyjnych i ograniczenia stresu w okresie rozwoju zarodkowego i po wykluciu, utrzymania biochemicznej i fizjologicznej stabilności zarodka oraz ograniczenia stanów zapalnych i zapewnienia homeostazy układu odpornościowego (Matsue i in., 2003; Arai i in., 2004; Zhou i in., 2011; Givisiez i in., 2020; Kpodo i Proszkowiec-Węglarz, 2023) wykorzystuje się metodę *in ovo*, polegającą na dostarczaniu do zarodka różnych związków biogennych (Malheiros i in., 2012; Lee i in., 2014; Yigit i in., 2014). Historia stosowania tej technologii sięga lat 40 XX wieku, kiedy przeprowadzano pierwsze eksperymenty z podawaniem do zarodków kurzych tiomocznika i hormonów, np. tyroksyny (Das i in., 2021). Przełomowe dla rozwoju technologii *in ovo* były lata 80 XX wieku, kiedy została ona wdrożona do szczepień przeciwko chorobom zakaźnym, w tym m.in. przeciwko chorobie Mareka (Das i in., 2021; Abd El-Ghany i in., 2025). Sukces szczepień metodą *in ovo* zapoczątkował zmianę strategii funkcjonowania przemysłu drobiarskiego, polegającą na dostosowywaniu technologii *in ovo* do osiągania korzyści ekonomicznych przez hodowców i producentów. W praktyce oznaczało to zmianę modelu stymulacji drobiu w okresie postnatalnym na stymulację w środowisku embrionalnym (prenatalnym).

Technologia *in ovo*, stosowana głównie w komercyjnej produkcji drobiu, posiada liczne zalety, ale także wady. Przykładowo, aktualnie brakuje standaryzacji metod podawania różnych substancji bioaktywnych do zarodka, w tym zwłaszcza określenia optymalnego wieku zarodka, pomiędzy 1 i 19 dniem rozwoju embrionalnego (ED1-ED19), a także doprecyzowania objętości

mieszaniny iniekcyjnej, miejsca iniekcji i stężenia substancji bioaktywnych (Roto i in., 2016). Do zalet tej technologii zaliczyć można natomiast kształtowanie korzystnego profilu mikrobiomu jelitowego już na etapie rozwoju embrionalnego, redukcję natężenia stresu oksydacyjnego, zapewnienie lepszej ochrony przed czynnikami zakaźnymi poprzez zwiększenie efektywności immunizacji, a także zwiększenie rezerw energetycznych zarodka i pisklęcia, umożliwiających wyklucie i przeżycie w pierwszych dniach po wylęgu (Roto i in., 2016; Siwek i in., 2018; Shehata i in., 2021). Wykazano, że podawanie różnorodnych związków bioaktywnych w technologii *in ovo* stymuluje układ odpornościowy, który chroni zarodek i pisklę przed infekcjami do trzeciego tygodnia po wykluciu, tj. do czasu pełnego rozwoju tego układu (Ranjitkar i in., 2016). Wśród licznych substancji bioaktywnych podawanych *in ovo* wymienia się m.in. witaminy, aminokwasy i ich metabolity, nukleotydy, elektrolity, mikro- i makropierwiastki, L-karnitynę, kreatynę i ekstrakty roślinne, węglowodany, hormony, minerały, oligodeoksynukleotydy, niemetylowane sekwencje CpG (cytozyna-fosforan-guanina), czynniki wzrostowe, np. EGF (epidermal growth factor), białka, immunostymulatory, np. szczepionki (Newcastle, Gumboro, ILT) oraz pre- pro- i synbiotyki (Kadam i in., 2013; Roto i in., 2016; Hou i Tako, 2018; Lu i in., 2022; Kpodo i Proszkowiec-Weglarz, 2023; Abd El-Ghany, 2025). Suplementy te stymulują rozwój organizmu poprzez zwiększenie efektywności wykorzystywania składników pokarmowych, co wpływa na wzrost ptaków, a także wzmagają odpowiedź immunologiczną, co przekłada się na zmniejszenie współczynnika zachorowalności i śmiertelności w okresie powylęgowym (Uni i Ferket, 2004). Spośród związków podawanych *in ovo* coraz większe znaczenie przypisywane jest probiotykom i niezbędnym pierwiastkom śladowym, takim jak cynk (Zn), które działają stymulująco na odporność ptaków i przyczyniają się do poprawy parametrów produkcyjnych (Kadam i in., 2013; Dunisławska i in., 2017; Hou i Tako, 2018; Alizadeh i in., 2020).

1.4. Rola cynku i probiotyków jako bioaktywnych czynników immunostymulujących u drobiu

Należący do mikropierwiastków cynk (Zn) pełni w organizmie różne funkcje fizjologiczne. Uczestniczy on m.in. w procesie ekspresji genów, syntezie DNA i białek, procesach sygnalizacji komórkowej, podziale komórek, syntezie białek strukturalnych, takich jak kolagen i keratyna, w procesach wzrostu i rozwoju układu rozrodczego i kostnego, a także bierze udział w procesach antyoksydacyjnych (MacDonald, 2000; De Grande i in., 2020; Chand i in., 2020, 2021; Besong i in., 2023; Shao i in., 2023). Szczególną funkcję pierwiastek ten pełni w obrębie

układu immunologicznego, gdzie oddziałują na aktywację i proliferację limfocytów, głównie limfocytów T i NK oraz pobudza komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej (Sunder i in., 2008; Jarosz i in., 2017a,b). Immunomodulujące działanie cynku przejawia się także zwiększeniem aktywności tymocytów, makrofagów i heterofilii oraz zwiększoną produkcją przeciwciał, co wzmacnia potencjał odpowiedzi typu humoralnego (Jarosz i in., 2019; Hidayat i in., 2020). Odpowiedni zasób tego pierwiastka w paszy dla zwierząt, zwłaszcza dla drobiu, wpływa istotnie na efektywność produkcji poprzez zwiększenie wydajności stada, poprawę stanu zdrowia ptaków, zmniejszenie współczynnika śmiertelności i ilości odpadów poubojowych oraz poprawę jakości pozyskiwanego mięsa i nieśności (Naz i in., 2016; Alirezaei Shahraki i in., 2024). Wymienione efekty oddziaływania cynku przekładają się wprost na wskaźniki ekonomiczne w intensywnym chowie i hodowli drobiu. W warunkach niedoboru cynku u drobiu dochodzi natomiast do zaburzeń odporności i w konsekwencji zwiększenia podatności na choroby, wyniszczenia organizmu i padnięć (Park i in., 2004; Hidayat i in., 2020). Dostarczenie odpowiedniej ilości cynku w dawce pokarmowej ma zatem fundamentalne znaczenie dla prawidłowego wzrostu i rozwoju drobiu oraz właściwego funkcjonowania mechanizmów odpornościowych.

Poza mikropierwiastkami często wykorzystywaną w praktyce grupę dodatków paszowych dla drobiu stanowią probiotyki, jakkolwiek mechanizmy ich oddziaływania na organizm są wielokierunkowe i nie do końca poznane (Jha i in., 2020). Dostępne dane piśmiennictwa w większości przedstawiają korzystne efekty stosowania probiotyków u drobiu w przypadku tradycyjnej metody ich podawania, tj. z paszą lub wodą w okresie powylęgowym (Lutful Kabir, 2009; Halder i in., 2024). Preparaty probiotyczne wykorzystywane w żywieniu drobiu zawierają najczęściej bakterie należące do rodzajów *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i *Weissella* (Guarner i Malagelada, 2003; Azad i in., 2018) oraz grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Candida* i *Saccharomyces*. Mechanizmy oddziaływania probiotyków na organizm ptaków są złożone, a spośród najczęściej opisywanych zwraca się uwagę na stymulację wydzielania substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, konkurencyjne przyleganie drobnoustrojów do nabłonka jelit, wzmocnienie bariery nabłonkowej jelita oraz modulacyjne oddziaływanie na układ odpornościowy drobiu (Yousaf i in., 2022; Naeem i Bourassa, 2025). Probiotyki stosowane u drobiu wywierają szczególny wpływ na produktywność poprzez zwiększenie tempa wzrostu ptaków, co przypisywane jest głównie zdolności pobudzania apetytu i zwiększeniu efektywności wykorzystania paszy, wyrażanej wyższym współczynnikiem konwersji paszy (Mountzouris i in., 2007; Thongsong i in., 2008). Zjawisko korzystnego wpływu probiotyków na parametry produkcyjne u drobiu związane jest także z

oddziaływaniem zawartych w nich drobnoustrojów na podstawowe funkcje fizjologiczne przewodu pokarmowego, czego efektem jest lepsze trawienie, wchłanianie i metabolizm, a także wzmocnienie bariery błony śluzowej jelita jako ochrony przed czynnikami szkodliwymi (Shini i Bryden, 2021; Obianwuna i in., 2023). Opublikowane dotychczas wyniki badań wskazują także na pozytywny wpływ probiotyków na nieśność kur niosek i zwiększenie masy jaj oraz przyspieszenie rozwoju i dojrzewania kur, co skutkuje szybszym rozpoczęciem okresu nieśności (Wang i in., 2024). Tego typu działanie probiotyków spowodowane jest w znacznej mierze zmianą flory mikrobiologicznej przewodu pokarmowego, która ułatwia trawienie i wchłanianie składników odżywczych wykorzystywanych do produkcji jaj (Naqvi i in., 2000). Suplementacja probiotykami paszy dla drobiu wpływa także znacząco na podniesienie jakości jaj. Cechują się one większą wysokością żółtka, wysokością białka, masą skorupki jaja, masą białka oraz wyższą jednostką Haugha (HU) (Obianwuna i in., 2022; Oketch i in., 2024). Ten korzystny wpływ uwarunkowany jest poprawą przyswajania składników odżywczych w przewodzie pokarmowym, takich jak wapń, fosfor, karotenoidy i białko oraz wzrostem ich stężenia w surowicy niosek. Z punktu widzenia konsumenta ważne jest też pozyskiwanie produktów drobiowych, charakteryzujących się m.in. niskim stężeniem cholesterolu w mięsie i jajach. Wykazano, że suplementacja probiotykami wpływa korzystnie na te parametry (Alaqil i in., 2020). Przykładowo, *Enterococcus faecium* obniża stężenie cholesterolu, lipidów i wapnia u kur niosek (Capcarova i in., 2010), natomiast *Lactobacillus sporogenes* lub *Lactobacillus salivarius* powoduje u brojlerów istotny wzrost stężenia białka i wapnia oraz obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, cholesterolu VLDL i trójglicerydów w surowicy (Panda i in., 2007; Shokryazdan i in., 2017a,b). Suplementacja paszy probiotykami zawierającymi szczepy *Bacillus* spp. oddziałuje na skład aminokwasowy białek i kwasy tłuszczowe w mięśniach, powodując wzrost zawartości lizyny (Lys), metioniny (Met), kwasu glutaminowego (Glu) i całkowitych niezbędnych aminokwasów (EAA), głównie w mięśniu piersiowym oraz stężenia kwasu oleopalmitynowego (C16:1), oleinowego (C18:1n9c) i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w mięśniach piersiowych i udowych (Tang i in., 2021). Takie działanie skutkuje poprawą cech sensorycznych mięsa drobiowego oraz jego jakości odżywczej i zdrowotnej.

Dostępne wyniki badań wskazują także na istnienie wielu mechanizmów pozytywnego oddziaływania probiotyków na układ immunologiczny, dzięki któremu zwiększają one odporność drobiu na infekcje (Lutful Kabir i in., 2004). Wykazano, że suplementacja probiotykami *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus johnsonii* skutecznie hamuje produkcję cytokin prozapalnych poprzez ograniczenie aktywacji NF-κB u brojlerów (Chon i in., 2010; Wang i in.,

2018). Liczne drobnoustroje mikrobiomu należące do LAB *Lactobacillus* spp. wpływają na ekspresję cytokin prozapalnych, tj. IL-6, IL-10, IL-1 β , INF- γ i TNF- α , a także uczestniczą w ograniczaniu stanu zapalnego zmniejszając ekspresję IL-1 β i zwiększając ekspresję mRNA TLR4 (Park i in., 2018; Cristofori i in., 2021; Raheem i in., 2021; Zhao i in., 2023). Zastosowanie probiotyku zawierającego *Lactobacillus casei* powoduje wzrost liczby limfocytów śród-nabłonkowych i ich migrację poprzez szlak sygnałowy chemokin, a także moduluje odporność śluzówkową poprzez zwiększenie w jej obrębie ekspresji cytokin, co potwierdza bezpośrednie oddziaływanie na układ GALT (tkanka limfatyczna związana z jelitami) (Tian i in., 2021, 2021a). Stymulując rozwój i różnicowanie limfocytów T i B (Zulkifli i in., 2000; Lutful Kabir i in., 2004; Haghighi i in., 2006) probiotyki regulują odpowiedź typu Th1/Th2 i pośrednio wpływają na zwiększenie masy narządów limfatycznych, śledziony i torebki Fabrycjusza, co jest efektem wzmożonego różnicowania komórek układu odpornościowego (Incharoen i in., 2019). Obok wspomnianych wcześniej głównych mechanizmów oddziaływania probiotyków na reakcje immunologiczne u drobiu wpływają one także na skład ilościowy i jakościowy mikrobiomu w świetle przewodu pokarmowego. Gatunki należące do rodzaju *Lactobacillus* dzięki zdolności przylegania do nabłonka jelitowego i konkurencyjnego wykluczania patogenów kolonizujących nabłonek jelitowy mogą zmniejszać liczbę patogennych bakterii *Campylobacter jejuni* i *Salmonella enterica* poprzez redukcję miejsc ich kolonizacji (Van Coillie i in., 2007). Także zastosowanie dodatków zawierających *Enterococcus faecium* przyczynia się do redukcji liczby patogenów w jelitach, np. *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* i *Salmonella* spp., dzięki wytwarzaniu szerokiej gamy bakteriocyn (Capcarova i in., 2010; Hanchi i in., 2018). Różne gatunki *Bacillus* spp. zdolne są natomiast do wytwarzania peptydów przeciwdrobnoustrojowych i enzymów, takich jak gramicydyna, tyrocydyna, bacytracyna, surfaktyna, ituryna i fengycyna, które wpływają na liczbę bakterii w jelitach (Abriouel i in., 2011; Sumi i in., 2015). W konsekwencji w przewodzie pokarmowym dochodzi do rearanżacji składu mikrobioty i dominacji pożytecznych drobnoustrojów w ekosystemie jelit.

1.5. Możliwości stosowania probiotyków wieloszczepowych opartych na efektywnych mikroorganizmach (EM) w produkcji drobiarskiej

Korzystny wpływ probiotyków na organizm można zwiększyć dodatkowo poprzez łączenie w składzie probiotyku wielu szczepów drobnoustrojów działających synergistycznie. We współczesnej produkcji drobiarskiej wykorzystuje się najczęściej probiotyki wieloszczepowe i wielogatunkowe, które oddziałują w różnych miejscach jelita i prezentują zróżnicowane mechanizmy działania (Ahmad i in., 2024; Younas i in., 2025). Wykazano, że zastosowanie

w żywieniu probiotyków wieloszczepowych efektywniej stymuluje wzrost kurcząt brojlerów (Mookiah i in., 2014) oraz wpływa na strukturę ściany i funkcjonowanie jelit, dzięki czemu poprawia się szczelność bariery nabłonka jelitowego i zmniejsza możliwość zakażeń bakteriami chorobotwórczymi (Lambo i in., 2021 Konieczka i in., 2022). Do tej grupy preparatów należą wykorzystywane w żywieniu drobiu probiotyki, zawierające w składzie efektywne mikroorganizmy, będące kompozycją różnych rodzajów tzw. pożytecznych drobnoustrojów, wśród których dominują bakterie kwasu mlekowego, bakterie fotosyntetyczne, drożdże, promieniowce, i grzyby fermentujące (Patterson i Burkholder, 2003). Opublikowane dotychczas wyniki badań wskazują na szerokie możliwości stosowania EM w różnych gałęziach przemysłu chemicznego, medycynie, rolnictwie (Higa i Parr, 1994), m.in. w produkcji roślinnej (Higa i Wididana, 1989) i w hodowli zwierząt (Szymanski i Patterson, 2003). W sektorze hodowlanym, po wycofaniu AGP, produkty oparte na EM stały się alternatywnymi dodatkami paszowymi, wykorzystywanymi w ekologicznej hodowli zwierząt gospodarskich, w tym drobiu, w celu poprawy wydajności wzrostu zwierząt oraz ograniczenia emisji odorów i ilości odpadów produkcyjnych (Kalavathy i in., 2003). Wykazano przykładowo, że stosowanie EM w żywieniu drobiu zmniejsza stężenie amoniaku w odchodach brojlerów i w kurnikach o 42,12% - 54,25% (Yongzhen i Weijiong, 1994; Chiang i Hsieh, 1995). EM dostarczane ptakom z wodą do picia lub z paszą odgrywają także istotną rolę w modulacji mikrobiomu przewodu pokarmowego zapewniając homeostazę środowiska jelit (Hamad i in., 2020). Takie działanie przyczynia się do zwiększenia tempa wzrostu, wydajności reprodukcyjnej, produkcji jaj i poprawy stanu zdrowia kurcząt (EMRO, 2010; Jwher i in., 2013). Zjawisko korzystnego wpływu EM na parametry produkcyjne jest związane z oddziaływaniem zawartych w probiotyku drobnoustrojów na podstawowe funkcje fizjologiczne przewodu pokarmowego, takie jak trawienie, wchłanianie i metabolizm, a także wzmocnieniem bariery błony śluzowej jelita (Valdéz i in., 2020; Ezzulddin i Jwher, 2022). Z licznych badań wynika, że EM stymulują u brojlerów proliferację komórek krypt jelita cienkiego, zwiększają wysokość kosmków jelita czczego i krętego oraz liczbę komórek kubkowych, wpływając na zwiększenie uwalniania mucyny i sprzyjając hamowaniu namnażania się chorobotwórczych bakterii w jelicie cienkim (Abdollahi i in., 2003; Shareef i Al-Dabbagh, 2009; Chichowski i in., 2007; Salim i in., 2011). Przykładowo, Morishita i in. (1997) wykazali, że EM stosowane u brojlerów mają zdolność ograniczania kolonizacji i wydalania z kałem patogenów chorobotwórczych, takich jak *Salmonella* i *Campylobacter*, które powszechnie występują w przewodzie pokarmowym ptaków (Hue i in., 2011). EM wpływają także aktywnie na obniżenie stężenia trójglicerydów i cholesterolu całkowitego w surowicy (Ignatova i in., 2009; Şahan i in., 2021), a także zawartości tłuszczu i cholesterolu w mięsie

drobiowym (Mansoup, 2011), poprawiając wskaźnik wydajności tuszy brojlerów i efektywność produkcji (Awad i in., 2009; Sugiharto i in., 2018). Jednym z najważniejszych efektów oddziaływania EM na organizm drobiu jest wpływ na odpowiedź immunologiczną, wyrażający się pobudzeniem komórkowych i humoralnych mechanizmów odpornościowych (Apata, 2008; Ashraf i Shah, 2014; Abd El-Hack i in., 2020). Wykazano m.in., że suplementacja paszy dla drobiu EM skutkuje zwiększeniem stężenia przeciwciał klasy IgY i IgM w surowicy w odpowiedzi na immunizację zawiesiną erytrocytów owcy (SRBC) (Esatu i in., 2011), a także ograniczeniem występowania wielu chorób zakaźnych, np. poprzez zwiększenie miana specyficznych przeciwciał przeciwko chorobie Newcastle (Jwher, 2014). Stosowanie EM w żywieniu drobiu prowadzi także do zwiększenia odsetka limfocytów i leukocytów krwi obwodowej, co potwierdza immunostymulującą aktywność drobnoustrojów zawartych w EM, wzmacniającą komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej (Salim i in., 2011; Jwher i in., 2013). Abd El-Hack i in. (2020) wykazali ponadto, że suplementacja EM wpływa na procesy odpornościowe poprzez zmiany strukturalne w jelitach i zwiększoną produkcję cytokin przez komórki enterocytarne, co pozytywnie wpływa na wyściółkę błony śluzowej jelit i chroni ptaki przed zakażeniem patogenami chorobotwórczymi.

1.6. Rola chelatu glicynowego cynku (Zn-Gly) jako immunomodulatora i czynnika wspierającego rozwój zarodków

Z punktu widzenia korzystnego oddziaływania na organizm drobiu ważnym składnikiem preparatów probiotycznych, obok drobnoustrojów, są pierwiastki, a zwłaszcza mikroelementy, w tym Zn. Ze względu na łatwą dostępność i niską cenę suplementu w mieszankach paszowych stosowanych w żywieniu drobiu wykorzystywana jest zwykle nieorganiczna forma Zn w postaci siarczanów lub tlenków (Wojciech i in., 2007; Khan i in., 2024). Długotrwałe stosowanie siarczanów cynku ma jednak niekorzystny wpływ na środowisko, ponieważ znaczna część tego pierwiastka nie ulega przyswajaniu i wydalana jest do środowiska z kałem (Feng i in., 2018). Siarczany cynku mogą przyczyniać się także do rozwoju lokalnych procesów zapalnych w obrębie jelit, co ogranicza procesy wzrostu i rozwoju oraz sprzyja zakażeniom (Jarosz i in., 2017a,b). Te niekorzystne zjawiska można skutecznie ograniczyć poprzez stosowanie w żywieniu drobiu chelatów cynku, które cechują się większą biodostępnością (Cao i in., 2000). Wykazano, że połączenia organiczne chronią pierwiastki śladowe przed tworzeniem nierozpuszczalnych kompleksów w przewodzie pokarmowym i ułatwiają transport związków mineralnych przez błonę śluzową jelit, co sprzyja efektywnemu oddziaływaniu na funkcje biologiczne orga-

nizmu (Kidd i in., 1996). Aktualnie na rynku paszowym propagowane jest stosowanie połączenia organicznego Zn z metioniną (Khan i in., 2024), natomiast nadal poszukuje się nowych kompleksów organicznych, w których cynk wykazywałby większą biodostępność, warunkującą zmniejszenie skażenia środowiska hodowlanego. Takie kryteria spełnia m.in. kompleks glicynowy, cechujący się większą stabilnością oraz jednorodnością chemiczną i fizyczną, a Zn w kompleksie z glicyną (Zn-Gly) jest lepiej wchłaniany przez ścianę jelit (Feng i in., 2007). Wykazano, że stosowanie chelatów glicynowych cynku korzystnie wpływa na wzrost ptaków i niektóre parametry immunologiczne (Jarosz i in., 2017a,b). Organiczne związki cynku stymulują komórkowe i humoralne procesy odpornościowe, zwiększając stężenie cytokin, koncentrację immunoglobulin klasy IgA, IgY i IgM w krwi obwodowej oraz syntezę białek ostrej fazy w surowicy i tkankach drobiu (Feng i in., 2010; Jarosz i in., 2017a,b, 2019). Wykazano, że zwiększają one także aktywność cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej zależnej od cynku i miedzi (Cu/ZnSOD-1) i peroksydazy glutationowej (GPX) oraz zmniejszają ilość dialdehydu malonowego (MDA) w wątrobie (Xie i in., 2025). Poprzez aktywowanie ogólnej, komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej organiczne związki cynku zapewniają utrzymywanie równowagi pomiędzy odpowiedzią typu Th1 i Th2 (Jarosz i in., 2017a).

1.7. Stosowanie probiotyku wieloszczepowego zawierającego EM oraz chelatu Zn-Gly w technologii in ovo

Probiotyki wieloszczepowe i organiczne postacie Zn stanowią grupę substancji bioaktywnych, które dzięki wysokiej stabilności i biodostępności mogą być skutecznie podawane techniką *in ovo*. Takie działanie umożliwia wczesne programowanie odporności i wspieranie rozwoju metabolicznego zarodków. Stosowanie związków bioaktywnych we wczesnym okresie rozwoju zarodkowego stanowi innowacyjną strategię sprzyjającą optymalizacji zdrowia i wyników produkcyjnych brojlerów poprzez modulację mikrobiomu, wsparcie bariery jelitowej oraz aktywację układu odpornościowego już w okresie prenatalnym (Kpodo i Proszkowiec-Węglarz, 2023).

Interakcja probiotyku z mikrobiomem jelitowym zarodka oraz kolonizacja jelit pożytecznymi bakteriami modyfikuje mikrobiom przez co ogranicza zasiedlanie przewodu pokarmowego patogenami chorobotwórczymi w okresie powylęgowym (Wilson i in., 2019). Stymulacja mikroflory jelitowej poprzez podanie *in ovo* drobnoustrojów probiotycznych odgrywa istotną rolę w rozwoju i regulacji odporności wrodzonej i nabytej (Clavijo i Flórez, 2018) nie tylko w okresie rozwoju zarodkowego, ale także po wylęgu, kiedy niedojrzała tkanka limfatyczna zwią-

zana z jelitami (GALT) poddawana jest stymulacji antygenowej przez drobnoustroje środowiskowe. Możliwość przeprogramowania mikrobiomu jelit kurcząt we wczesnym etapie rozwoju embrionalnego może się przyczyniać do zwiększenia odporności ptaków dzięki ukierunkowanej modulacji komórkowych i/lub humoralnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej (Shehata i in., 2021). Dowodów na poparcie tej tezy dostarczają wyniki badań eksperymentalnych, w których wykazano szeroko ukierunkowaną aktywność immunomodulacyjną drobnoustrojów probiotycznych w odniesieniu do lokalnych i ogólnoustrojowych narządów limfatycznych ptaków (Alizadeh i in., 2020). Alizadeh i in. (2020) wykazali, że podanie *in ovo* w 18 dniu inkubacji mieszaniny *Lactobacillus* spp. zmniejszało ekspresję mRNA genów cytokin prozapalnych Il-2, Il-6 i Il-8 w kępkach Peyera, natomiast zwiększało tę ekspresję w śledzionie, przy czym w komórkach śledziony nie stwierdzono różnic w odsetku subpopulacji komórek z ekspresją CD4⁺, CD8⁺ i MHC II⁺. Podanie *in ovo* bakterii kwasu mlekowego zwiększa także produkcję przeciwciał IgG i IgM w okresie powylęgowym, skierowanych przeciwko immunogenemu antygenowi zależnemu od limfocytów T (KLH, adiuwant, hemocyjanina z małża morskiego *Megathura crenulata*, keyhole limpet hemocyanin), co sugeruje stymulujący wpływ tych bakterii na odporność nabytą i dowodzi pobudzenia odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego (Alizadeh i in., 2020). Podobne wyniki uzyskali Pender i in. (2017) którzy wykazali, że podanie *in ovo* złożonego probiotyku zawierającego *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, i *Bifidobacterium bifidum* oddziałuje immunomodulacyjnie zwiększając ekspresję genów związanych z odpornością w jelicie biodrowym (iNOS, TLR-2) i kępkach Peyera (iNOS, TLR-2, TLR-4, Il-4), co przyczynia się do poprawy ogólnego stanu zdrowia ptaków i ograniczenia zakażeń w pierwszych dniach odchowu. Pender i in. (2017) wykazali ponadto, że podanie *in ovo* probiotyków zawierających *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. faecium* i *B. bifidum* zmniejsza ekspresję receptorów typu Toll-2 i -4, syntazy tlenku azotu (NOS), czynnika lektyny - Trefoil factor 2, mucyny-2, INF- γ oraz IL-4 i IL-13 w błaszcze właściwej błony śluzowej jelita czczego oraz w kępkach Peyera jelita czczego i biodrowego, które uczestniczą w regulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Stosowanie metodą *in ovo* probiotyków zawierających *Lactiplantibacillus plantarum* przyczynia się natomiast do zwiększenia zdolności wychwytywania wolnych rodników poprzez wzrost ekspresji przeciwutleniaczy, w tym katalazy (CAT), SOD1, dysmutazy ponadtlenkowej manganowej (MnSOD) i czynnika jądrowego erytroidalnego 2 (NRF2) w wątrobie, śledzionie i mięśni piersiowym, przeciwdziałając stresowi oksydacyjnemu (Yang i in. 2024; Mangan i in., 2025). Efekty takiego działania widoczne są w życiu postnatalnym kurcząt, które są w tym okresie w mniejszym stopniu narażone na działanie licznych czynników stresogennych, takich jak stres

cieplny, infekcje patogenami i zaburzenia metaboliczne (Mu i in. 2018; Mounir i in. 2022; Yang i in. 2024). Warto podkreślić, że stosowanie *in ovo* różnych szczepów probiotycznych wpływa w sposób zróżnicowany na parametry stresu oksydacyjnego (Wang i in., 2017). Przykładowo, podanie *in ovo* *L. salivarius* i *Pediococcus* spp. zwiększa potencjał antyoksydacyjny, podczas gdy stosowanie *Citrobacter freundii* 97A11 nasila reakcje prozapalne i odpowiedź na stres oksydacyjny (Mishra i Jha, 2019; Das i in., 2021; Shehata i in., 2021). Wykazano ponadto, że stosowanie *in ovo* bakterii z rodzaju LAB zwiększa ekspresję peroksyredoksyny-1 i dysmutazy nadadtlenkowej-1 w tkankach jelita, które chronią komórki przed uszkodzeniem przez wolne rodniki i nadtlenek wodoru oraz łagodzą objawy stresu oksydacyjnego (Mishra i Jha, 2019; Das i in., 2021).

Ważną rolę w procesie rozwoju zarodka kurzego odgrywa Zn podawany *in ovo* (Tako i in., 2005). Podobnie jak inne minerały jest on magazynowany w żółtku jaja (Gao i in., 2021), stanowiącym magazyn składników odżywczych i wykorzystywany przez zarodek, a jego wchłanianie jest najintensywniejsze w ostatnim etapie rozwoju zarodkowego (Yair i in. 2011; Yair i in., 2013; Oliveira i in., 2015; Joshua i in., 2016). Wchłaniany przez zarodek cynk uczestniczy w licznych procesach biochemicznych, m.in. w syntezie białek o właściwościach przeciwutleniających i chroniących struktury komórkowe przed wolnymi rodnikami, tj. metalotioneiny (MT) i zawierającej Zn dysmutazy nadadtlenkowej (Zn-SOD) (Zhang i in., 2022; Wang i in., 2022). Dlatego uważa się że Zn, który uczestniczy w procesach rozwojowych embrionów drobiu odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu zdolności antyoksydacyjnej, zwłaszcza w ostatnich etapach rozwoju zarodka. W ostatnich dniach inkubacji oraz podczas klucia wzrasta tempo metabolizmu i wykorzystania tlenu przez zarodek, co sprzyja powstawaniu reaktywnych form tlenu (ROS) (Surai i in., 2016). ROS przyspieszają procesy utleniania lipidów zawartych w żółtku, co może prowadzić do uszkodzenia błon komórkowych i w efekcie do śmierci zarodka (Speake i in., 1998a,b; Surai, 1999; Hohtola, 2002; Surai i in., 2016). W tym kontekście zwiększenie zdolności zarodka do obrony przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego należy postrzegać jako jedną z metod zapobiegających ich zamieraniu (Li i in., 2013; Zhang i in., 2018). Wykazano, że stosowanie u drobiu Zn-Gly, poprzez aktywację szlaku sygnałowego NRF2 w zarodkach, zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenia MT w wątrobie oraz obniża aktywność kaspazy-3, przez co ogranicza uszkodzenia tkanek w procesach apoptozy i stresu oksydacyjnego (Zhang i in., 2022). Dodatkowo, podanie cynku *in ovo* zwiększa jego stężenie i resorpcję przez zarodek, co pozytywnie wpływa na parametry zdrowotne i produkcyjne w okresie powylęgowym (Kim i Kang; 2022). Wchłaniany przez zarodek Zn ku-

muluje się w organizmie głównie w wątrobie i uczestniczy w budowie tkanek i narządów rozwijającego się pisklęcia. Dowodzą tego m.in. badania Yair i Uni (2011) którzy wykazali, że suplementacja Zn *in ovo* wpływa na poprawę mineralizacji i właściwości mechanicznych kości zarodków i piskląt po wylęgu. Podawanie Zn metodą *in ovo* nie tylko stymuluje wzrost i rozwój zarodków i piskląt, ale także wzmacnia odporność (Tako i in., 2005). Efektywność takiej metody dostarczania niezbędnych pierwiastków śladowych potwierdzono w kilku badaniach eksperymentalnych (Goel i in. 2012; Olatunbosun i in., 2022; Kim i Kang 2022), w których wykazano, indukowane podaniem organicznych i nieorganicznych postaci cynku, pobudzenie odporności komórkowej, wyrażone proliferacją i różnicowaniem limfocytów w narządach oraz odpowiedzi typu humoralnego, wyrażone zwiększeniem stężenia immunoglobulin. Palouj i in. (2021) wykazali ponadto, że podanie *in ovo* Nano-ZnO skutkuje zwiększeniem syntezy Il-2 i Il-12, co przemawia za stymulacją odporności komórkowej wyrażającą się proliferacją i różnicowaniem limfocytów w narządach. Podawanie *in ovo* organicznych soli cynku pobudzało również odporność humoralną u brojlerów linii Arbor Acre i Cobb 500 (Olatunbosun i in., 2022), wyrażoną poprzez zwiększoną zdolność limfocytów B do wytwarzania przeciwciał przeciwko SRBC. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach Kim i Kang (2022), którzy wykazali, że dostarczanie zarodkowi metodą *in ovo* różnych postaci Zn zwiększa stężenie immunoglobuliny IgY indukując odpowiedź typu humoralnego.

Pomimo wykazywanego w licznych badaniach korzystnego wpływu probiotyków wieloszczepowych i chelatów glicynowych cynku na odporność ptaków dotychczas nie poznano w pełni mechanizmów odpowiedzialnych za wpływ skojarzonego stosowania tych preparatów na funkcje układu immunologicznego drobiu. W szczególności, nie określono wpływu tych związków na rozwój układu odpornościowego, zwłaszcza na kontrolowanie odpowiedzi immunologicznej poprzez syntezę i aktywację cytokin pro- i przeciwzapalnych, białek ostrej fazy i immunoglobulin. Nie zbadano także zależności pomiędzy stosowaniem probiotyków wieloszczepowych i chelatów glicynowych cynku i zjawiskiem programowania embrionalnego zarodków kurzych, zgodnie z założeniem wczesnej kontrolowanej ekspozycji na mikroorganizmy, tzw. hipotezy higienicznej.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Celem pracy było kompleksowe zbadanie wpływu suplementacji *in ovo* wieloszczepowego probiotyku zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM Provet) oraz chelatu glicynowego cynku (Zn-Gly) na rozwój odporności, zdrowotność i wyniki produkcyjne brojlerów kurzych. W badaniach oceniono możliwości zastosowania wczesnej immunomodulacji, już w okresie zarodkowym, w celu stymulacji humoralnych i komórkowych mechanizmów odpornościowych oraz ograniczenia śmiertelności ptaków w pierwszym okresie życia. Dodatkowo, badania obejmowały analizę jakości mięsa i wskaźników produkcyjnych, co pozwala na ocenę potencjalnych korzyści ekonomicznych związanych ze stosowaniem tych preparatów w hodowli drobiu. Realizacja niniejszych badań miała także w założeniu dostarczenie nowych informacji na temat interakcji pomiędzy probiotykiem wieloszczepowym i organiczną formą cynku oraz układem odpornościowym brojlerów, umożliwiającą opracowanie skutecznych strategii wspierających zdrowotność i dobrostan ptaków.

Uzyskane wyniki będą mogły stanowić podstawę opracowania rekomendacji w zakresie stosowania tego typu preparatów metodą *in ovo*. Przewiduje się, że wdrożenie tej technologii do procesu produkcyjnego kurcząt brojlerów przyczyni się do poprawy efektywności produkcji oraz ograniczenia strat ekonomicznych związanych z chorobami we wczesnym etapie życia i rozwoju ptaków.

Podjętym badaniom eksperymentalnym przyświecały następujące cele:

Cel poznawczy – ocena wpływu suplementacji *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na wybrane wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej kurcząt brojlerów w okresie poylęgowym.

Cel aplikacyjny – ocena efektywności suplementacji *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly w aspekcie hodowlanym poprzez analizę wybranych wskaźników zdrowotnych i produkcyjnych.

W badaniach poddaliśmy weryfikacji następujące hipotezy:

- podanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu glicynowego cynku w okresie rozwoju zarodkowego oddziałuje immunomodulacyjnie oraz wzmacnia komórkowe

i humoralne mechanizmy odporności chroniąc ptaki przed zakażeniem w pierwszym okresie życia po wylęgu;

- skojarzona suplementacja probiotykiem wieloszczepowym zawierającym efektywne mikroorganizmy oraz chelatem glicynowym cynku w 17 dniu (ED17) rozwoju embrionalnego wpływa na poprawę parametrów zdrowotnych nowo wyklutych piskląt poprzez zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego i funkcji odpornościowych;
- podanie wieloszczepowego probiotyku i chelatu Zn-Gly metodą *in ovo* prowadzi do zmian w profilu proteomu i peptydomu tkanek i narządów oraz zmian w stężeniu Zn w surowicy i tkankach kurcząt. Identyfikacja białek różnicujących i ich modyfikacji po-translacyjnych wskaże na zasadność stosowania badanych suplementów metodą *in ovo*;
- skojarzona suplementacja probiotykiem wieloszczepowym zawierającym efektywne mikroorganizmy oraz chelatem glicynowym cynku w 17 dniu (ED17) rozwoju embrionalnego wpływa na metabolizm lipidów zwiększając syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), trójglicerydów oraz obniżając syntezę LDL i MDA w surowicy i tkankach nowo wyklutych piskląt, co prowadzi do hamowania procesów peroksydacji lipidów i zwiększenia zdolności antyoksydacyjnych organizmu;
- suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i chelatem glicynowym cynku moduluje wczesną odpowiedź immunologiczną kurcząt brojlerów poprzez wpływ na komórkowe i humoralne mechanizmy odpornościowe, w tym syntezę białek immunoregulacyjnych biorących udział w utrzymywaniu równowagi Th1/Th2;

3. MATERIAŁ I METODY

Szczegółowy opis materiałów i metodyki badań zawarty jest w jednotematycznym cyklu publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

Zaprezentowane w jednotematycznym cyklu publikacji wyniki badań uzyskano w oparciu o doświadczenie przeprowadzone w Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Gorzyń 4, w gminie Międzychód. Wszystkie procedury badawcze wykorzystywane w doświadczeniu zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (nr zgody 106/2022 z dnia 17 października 2022 r.). W trakcie realizacji doświadczenia przestrzegano zasad dobrostanu zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych do celów naukowych, zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (z późn. zm.) oraz dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Wszystkie prace eksperymentalne uwzględniają ten sam schemat doświadczenia, obejmujący jednolity protokół podawania substancji metodą *in ovo* oraz identyczne warunki utrzymania i żywienia ptaków w okresie odchowu. We wszystkich doświadczeniach zastosowano jednakowe kryteria podziału ptaków na grupy doświadczalne i kontrolne. Opis okresu inkubacji jaj oraz szczegółowa metodologia stosowania wieloszczepowego probiotyku opartego o EM i chelatu Zn-Gly zawarte zostały w części „Materiał i metody” w Pracy I.

Praca I

3.1. *“Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens”*

3.1.1. *Okres inkubacji i schemat podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly*

Jaja kurze wykorzystane w eksperymencie pozyskano z komercyjnego stada rodzicielskiego brojlerów (Ross x Ross 308) w wieku 36 tygodni i przetransportowano do Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Gorzyń 4, gm. Międzychód. Przed ważeniem i rozpoczęciem inkubacji jaja przechowywano przez 24 godziny w temperaturze 21°C. Przed umieszczeniem w inkubatorze wszystkie jaja zostały indywidualnie zważone i oznakowane, a następnie skorupki zdezynfekowano preparatem Viron FF (glutaraldehyd, chlorek di-decyldimetyloamoniowy, czwartorzędowe związki amoniowe i benzyl-C12-C16-alkilodimetylo, DDD-1), Bielsko Biała, Polska w stężeniu 1 ml/l.

W celu inkubacji w inkubatorze JARSON Model JD-18 (Gostyń, Polska) umieszczono łącznie 1500 jaj wybranych losowo. Inkubację przeprowadzono w standardowych warunkach (temperatura 37,8°C, wilgotność względna 55–60%) w czasie od 1 do 18 dnia. W 19 dniu inkubacji (DOI) jaja przeniesiono do komory wylęgowej JARSON Model ATLAS-180. W ostatnich 3 dniach inkubacji (19–21 DOI) wilgotność względną utrzymywano w granicach 60–65%. W 7 i 17 dniu inkubacji wszystkie jaja poddawano kontroli owoskopowej, a jaja niezapłodnione, zawierające martwe zarodki lub z uszkodzoną skorupą usuwano (Ernst i in., 2004).

W 17 dniu inkubacji, po kontroli owoskopowej, pozostałe zapłodnione jaja w liczbie 1400 szt. o zbliżonej masie podzielono losowo na 4 grupy eksperymentalne, po 10 powtórzeń w każdej grupie i 35 jaj w każdym powtórzeniu (łącznie 350 jaj/grupę). Grupę kontrolną – I stanowiły jaja, którym suplementowano *in ovo* sterylne 0,9% roztwór soli fizjologicznej; grupę doświadczalną – II stanowiły jaja, którym podano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy (1×10^5 CFU/jajo *Saccharomyces cerevisiae*; 1×10^7 CFU/jajo *Lactobacillus casei*; 1×10^7 CFU/jajo *Lactobacillus plantarum*); grupę doświadczalną – III stanowiły jaja, którym podano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat glicynowy cynku (1×10^5 CFU/jajo *S. cerevisiae*; 1×10^7 CFU/jajo *L.*

casei; 1×10^7 CFU/jajo *L. plantarum*; 100 µg/jajo Zn-Gly); grupę doświadczalną – IV stanowiły jaja, którym podano *in ovo* chelat glicynowy cynku (100 µg/jajo Zn-Gly) (Tabela 1).

Użyty w doświadczeniu probiotyk wieloszczepowy EM Provet został wyprodukowany i dostarczony w postaci proszku przez firmę Greenland Technologia EM (Janowiec, Polska). EM Provet zawiera mieszaninę żywych mikroorganizmów *Saccharomyces cerevisiae* – 5×10^6 CFU/g, *Lactobacillus casei* – 5×10^8 CFU/g i *Lactobacillus plantarum* – 5×10^8 CFU/g. Otrzymany proszek EM Provet rozcieńczano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), aby uzyskać roztwór zawierający 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* i 1×10^7 CFU *L. plantarum* w 100 µl roztworu. Żywotność komórek bakterii probiotycznych i ich zawartość w 1 gramie produktu (CFU/g) badano zgodnie z opisem Weese i Martina (2011).

Użyty w doświadczeniu chelat Zn-Gly został wyprodukowany przez firmę ARKOP Sp. z o.o. i dostarczony w postaci proszku. Preparat ten zawierał 250 mg Zn-Gly w 1 gramie produktu. Otrzymany preparat rozpuszczano w wodzie laboratoryjnej Milli-Q w celu uzyskania roztworu zawierającego 100 µg Zn-Gly/100 µl MQ.

Suplementację *in ovo* przeprowadzano w 17 dniu inkubacji jaj poprzez podanie do worka owodniowego równej objętości (500 µl) 0,9% roztworu soli fizjologicznej lub związku bioaktywnego (Tabela nr 1). Iniekcję *in ovo* przeprowadzano ręcznie przy użyciu igły 23 G o długości 2,5 cm. Otwory w skorupach natychmiast uszczelniano sterylną parafiną, po czym jaja ponownie umieszczano w inkubatorze. Wykorzystane w tej części doświadczenia metody zostały szczegółowo opisane przez Alizadeh i in. (2020).

Schemat realizacji doświadczenia przedstawia Rycina 1.

Rycina 1. Schemat realizacji doświadczenia (Praca I)

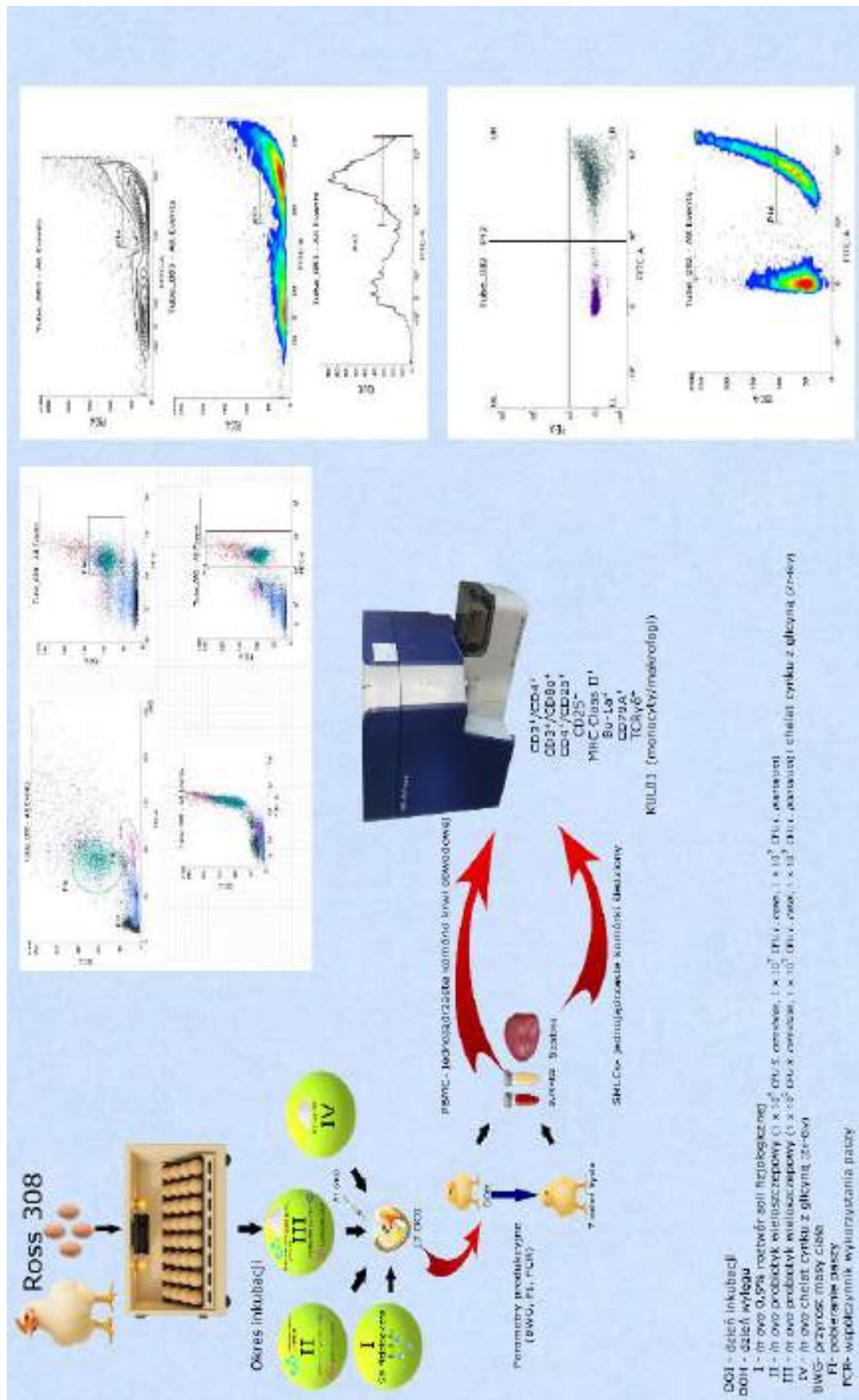


Tabela 1. Schemat suplementacji *in ovo*

Suplementacja <i>in ovo</i> – (17 dzień inkubacji)				
Grupa	Powtórzenia/liczba jaj w powtórzeniu N =	Zawartość probiotyku wieloszczepowego w 100 µl	Zawartość chelatu glicynowo cynkowego (Zn-Gly) w 100 µl	Objętość bioaktywnych związków podanych <i>in ovo</i>
I – kontrolna	10/35 350	-	-	500 µl 0,9 % NaCl
II	10/35 350	1 × 10 ⁵ CFU/jajo <i>S. cerevisiae</i> 1 × 10 ⁷ CFU/ jajo <i>L. casei</i> 1 × 10 ⁷ CFU/ jajo <i>L. plantarum</i>	-	100 µl probiotyk wieloszczepowy + 400 µl wody MQ
III	10/35 350	1 × 10 ⁵ CFU/ jajo <i>S. cerevisiae</i> 1 × 10 ⁷ CFU/ jajo <i>L. casei</i> 1 × 10 ⁷ CFU/ jajo <i>L. plantarum</i>	100 µg Zn-Gly/100 µL wody MQ/jajo	100 µl probiotyk wieloszczepowy + 100 µg Zn-Gly /100 µl wody MQ + 300 µl wody MQ
IV	10/35 350	-	100 µg Zn-Gly/100 µL wody MQ /jajo	100 µl Zn-Gly + 400 µl wody MQ

CFU- jednostka tworząca kolonie (Colony Forming Unit), MQ- woda ultraczysta (ultrapure water)

3.1.2. Warunki utrzymania i odchowu ptaków

Po wykluciu pisklęta ze wszystkich grup poddawano seksowaniu, a następnie wybierano losowo do dalszych etapów badań po 150 jednodniowych kurcząt płci żeńskiej z każdej grupy. Grupy doświadczalne i grupę kontrolną podzielono na 10 powtórzeń po 15 ptaków na powtórzenie. Zamieszczone w Pracy I wyniki badań obejmowały pierwsze 7 dni życia kurcząt. W tym okresie ptaki były karmione paszą odpowiednią dla początkowego okresu odchowu, tj. paszą startową S (Starter) w postaci kruszonki, nie zawierającą związków bioaktywnych, kokcydiostatyków i antybiotyków. Skład paszy opracowano zgodnie z zaleceniami żywieniowymi dla kurcząt brojlerów Ross 308 (Aviagen, *Broiler Ross Nutrition Supplement*). Szczegółowy skład paszy zamieszczono w Pracy I. Ptaki doświadczalne utrzymywano w jednolitych, kontrolowanych warunkach środowiskowych zgodnie z zaleceniami dla tej linii genetycznej drobiu.

Kurczęta odchowywano w kojcach wyścielonych wiórami drzewnymi w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze i wilgotności. Kojce wyposażono w automatyczne linie karmie-

nia i poidła smoczkowe. Oświetlenie dostosowywano do wieku i rytmu dobowego ptaków. Natężenie światła w okresie do 7 dnia życia wynosiło od 30 do 40 luksów, temperaturę utrzymywano w granicach 31–33°C, a wilgotność względną w granicach 60% ± 10%.

3.1.3. Ocena parametrów produkcyjnych

W dniu wylęgu obliczano wskaźnik wylęgowości stosując następujący wzór: Wylęgowość = (liczba piskląt wykłutych w 21 dniu/liczba jaj suplementowanych *in ovo*) × 100%.

W trakcie doświadczenia ptaki dwukrotnie ważono przed karmieniem, tj. w dniu 0 (12 godz. po wylęgu) i 7 dniu życia. We wskazanych terminach dla każdego powtórzenia i w każdej grupie obliczano średnie przyrosty masy ciała (BWG), spożycie paszy (FI) i współczynnik wykorzystania paszy (FCR).

3.1.4. Pobieranie krwi i izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobierana w 12 godz. po wykłuciu od piskląt uśmierconych przez dekapitację i w 7 dniu po wykłuciu, z żyły skrzydłowej kurcząt. Krew pobierano do probówek podciśnieniowych typu Vacuette, zawierających heparynę jako antykoagulant (Vacuette, Medlab Products, Raszyn, Polska) oraz do probówek z aktywatorem wykrzepiania i separacji surowicy (Medlab Products, Poland). Próbkę krwi pobierano w każdej z grup doświadczalnych i w grupie kontrolnej od 3 ptaków z każdego powtórzenia (łącznie 30 próbek). Próbek krwi nie łączono. Komórki PBMC izolowano z krwi pobranej od wszystkich kurcząt z każdej z grup doświadczalnych i kontrolnej w każdym terminie oznaczeń.

3.1.5. Ocena wybranych wskaźników humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej we krwi i śledzionie kurcząt

Do oznaczania wybranych wskaźników komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej wykorzystywano metodę cytometrii przepływowej. Próbkę krwi i śledziony pobrane od kurcząt analizowano w cytometrze przepływowym BD FACSVerse™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Brea, NJ). W każdym pomiarze rejestrowano od 10 000 do 30 000 zdarzeń. Kalibrację cytometru przeprowadzano z zastosowaniem kompensacji elektronicznej w celu wyeliminowania resztkowego nakładania się widm pomiędzy poszczególnymi fluorochromami. Uzyskane wyniki badań analizowano przy użyciu oprogramowania XL SYSTEM II w wersji 3.0 w formacie FCS 2.0, generując dane w formie histogramów.

3.1.5.1. Oznaczanie cząsteczek powierzchniowych (CD) w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) kurcząt

W badaniach cytometrycznych wykorzystywano przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromami, skierowane przeciwko cząsteczkom powierzchniowym limfocytów kurcząt (Tabela nr 2). Wszystkie oznaczenia wykonywano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta przeciwciał. Jednoetapowe znakowanie komórek zastosowano dla następujących przeciwciał: CD3:FITC, CD25:FITC, CD4:RPE lub CD4:FITC, CD8 α :RPE, CD79A:FITC, MHC klasy II:FITC i Bu-1A:RPE. Dwuetapową metodę znakowania komórek zastosowano dla przeciwciał TCR $\gamma\delta^+$ i KUL01 $^+$ (monocyty/makrofagi). W metodzie tej wykorzystywano dodatkowo poliklonalne przeciwciała drugorzędowe Rabbit F(ab')₂ anti-Mouse IgG:FITC lub Goat anti-Mouse IgG (H/L):FITC. W każdej próbce PBMC izolowanych z krwi kurcząt oddzielnie oznaczano CD3 $^+$ /CD4 $^+$, CD3 $^+$ /CD8 α^+ , CD4 $^+$ /CD25 $^+$, CD25 $^+$, MHC klasy II $^+$, Bu-1A $^+$, CD79A $^+$, TCR $\gamma\delta^+$ i KUL01 $^+$ (monocyty/makrofagi). PBMC poddawano analizie cytometrycznej dwukrotnie, tj. w 12 godz. po wykluciu i w 7 dniu życia.

3.1.5.2. Oznaczanie cząsteczek powierzchniowych (CD) w izolowanych jednojądrzastych komórkach śledziony (SMLCs) kurcząt

Do badań cytometrycznych próbki śledziony pobierano od trzech kurcząt z każdego powtórzenia w każdej z grup doświadczalnych i w grupie kontrolnej. Próbki śledziony pobierano w 12 godz. po wykluciu i w 7 dniu życia kurcząt. Z każdej próbki śledziony izolowano jednojądrzaste komórki zgodnie z procedurą opisaną przez Alizadeh i in. (2020). W każdej próbce komórek jednojądrzaste śledziony oddzielnie oznaczano CD3 $^+$ /CD4 $^+$, CD3 $^+$ /CD8 α^+ , CD4 $^+$ /CD25 $^+$, CD25 $^+$, MHC klasy II $^+$, Bu-1A $^+$, CD79A $^+$, TCR $\gamma\delta^+$ i KUL01 $^+$ (monocyty/makrofagi) przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSVersTM.

Tabela 2. Przeciwciała monoklonalne wykorzystywane w badaniach cytometrycznych

Marker	Klon	Izotyp	Fluorochrom	Komórki docelowe
CD3	CD3-12	Szczurze IgG1	FITC	Limfocyty T
CD4	2-35	Mysie IgG2b	FITC i RPE	Limfocyty CD4 ⁺ T
CD8 α	11-39	Mysie IgG1	RPE	Limfocyty CD8 ⁺ T
CD25	AbD13504	HuCAL Fab-dHLX-MH bivalent	FITC	Aktywowane limfocyty T
MHC klasy II	21-1A6	Mysie IgG1	FITC	Komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B)
TCR $\gamma\delta$	TCR-1	Mysie IgG1	Przeciwciało wtórne – królicze F(ab') ₂ anti-Mouse IgG:FITC	Limfocyty $\gamma\delta$ T
Bu-1A	L22	Mysie IgG1	FITC	Limfocyty B
Ludzki CD79A (reaktywność krzyżowa)	HM57	Mysie IgG1	FITC	Limfocyty B w trakcie różnicowania
Monocyty/makrofagi	KUL01	Mysie IgG1	Przeciwciało wtórne – kozie anti-Mouse IgG (H/L):FITC	Monocyty i makrofagi

FITC – izotiocyanian fluoresceiny; RPE – fikoerytryna.

3.1.6. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej z użyciem programu Statistica 13.2 PL (StatSoft, Kraków, Polska). Podstawą analizy było zbadanie rozkładu danych testem Shapiro-Wilka, a wyniki testu wyrażono za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego $\pm$ SD. Ze względu na brak rozkładu normalnego danych wykorzystano nieparametryczne testy istotności różnic dla poziomu istotności $p < 0,05$. W celu oceny i porównania komórkowych i humoralnych parametrów odpowiedzi immunologicznej pomiędzy grupą kontrolną (I) i grupami eksperymentalnymi (II–IV) w poszczególnych terminach oznaczeń (12 godz., 7 dzień) zastosowano nieparametryczną analizę wariancji ANOVA rang Kruskala i testy post-hoc dla prób niezależnych. Wpływ czasu (zmienna grupująca) na odpowiedź immunologiczną analizowano za pomocą testu U Manna-Whitneya. Wyniki badań przedstawiono w formie graficznej, w której te same oznaczenia za pomocą małych liter wskazują na brak istotnych różnic statystycznych dla grup I-IV, a duże litery ukazują wyniki porównań w czasie.

Ocenę statystyczną parametrów produkcyjnych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania statystycznego SAS[®] w wersji 9.4 (SAS Institute, 2011). Wszystkie dane przedstawiono jako wartości średnie z uwzględnieniem łącznego błędu standardowego średniej (SE). Do określenia wpływu badanych czynników eksperymentalnych na parametry produkcyjne zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W odniesieniu do wszystkich cech istotność różnic między średnimi wartościami grup weryfikowano testem Tukeya.

Praca II

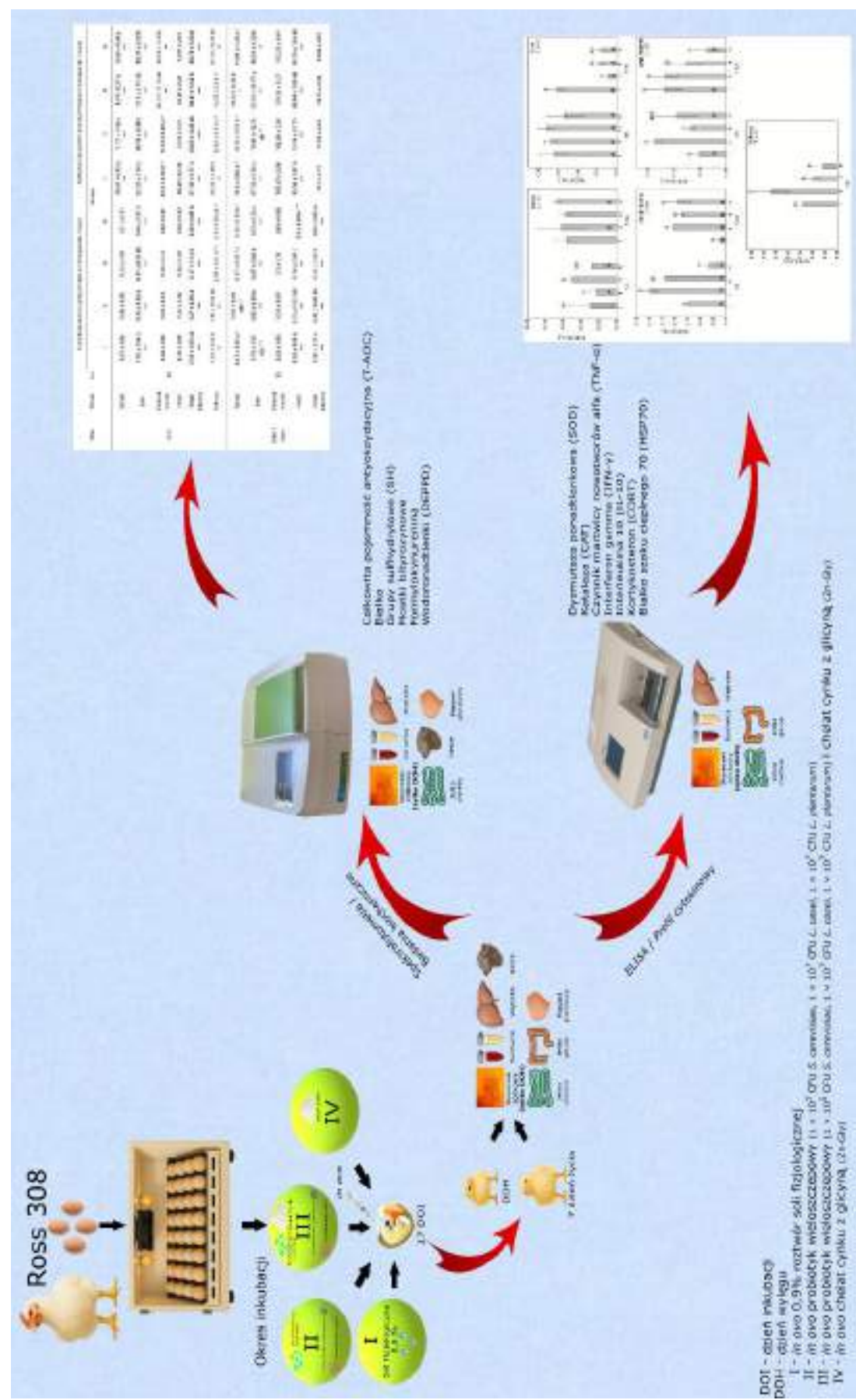
3.2. „Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks”

3.2.1. Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchowu ptaków

Okres inkubacji i schemat podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchowu ptaków zostały opisane w punkcie 1 w Pracy I.

Schemat realizacji doświadczenia przedstawia Rycina 2.

Rycina 2. Schemat realizacji doświadczenia (Praca II)



3.2.2. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobierana w 12 godz. po wykluciu od piskląt uśmiercanych przez dekapitację i w 7 dniu po wykluciu, z żyły skrzydłowej kurcząt. Krew pobierano do probówek podciśnieniowych typu Vacuette, zawierających heparynę jako antykoagulant (Vacuette, Medlab Products, Raszyn, Polska) oraz do probówek z aktywatorem wykrzepiania i separacji surowicy (Medlab Products, Poland). Próbkę krwi pobierano od 3 ptaków z każdego powtórzenia (łącznie 30 próbek) w każdej grupie doświadczalnej i grupie kontrolnej. Próbek krwi nie łączono. Próbkę krwi transportowano do laboratorium w temperaturze +4°C w ciągu 1 godziny i wirowano w temperaturze pokojowej (20–22°C) przez 15 minut przy 1000g. Uzyskane próbki surowicy przechowywano w temperaturze –80°C do dalszej analizy.

W analogicznych terminach od tych samych kurcząt pobierano do badania tkanki. W 12 godz. po wykluciu pobierano fragmenty wątroby, jelita cienkiego i grubego, serca, mięśnia piersiowego i woreczka żółtkowego, natomiast w 7 dniu życia pobierano fragmenty wątroby, jelita cienkiego i grubego, serca i mięśnia piersiowego. Próbkę tkanek nie były łączone. Poszczególne próbki tkanek (3 g) homogenizowano w urządzeniu Ultra Turrax (Ikawerk, Janke, Kunkel, Staufen, Niemcy) w buforze fosforanowym (0,1 mol/L, pH = 7,0), Tritonie X-100 i mieszaninie inhibitorów proteazy (Sigma, Polska). Homogenaty wirowano w temperaturze 4°C przez 20 minut przy 6500g. Otrzymane supernatanty przechowywano w temperaturze –20°C do dalszych analiz.

3.2.3. Oznaczanie stężenia IL-10, IFN- γ , TNF- α , kortykosteronu, Hsp 70, katalazy (CAT) i dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) w surowicy i tkankach kurcząt

W surowicy i tkankach kurcząt oznaczano stężenie IFN- γ , IL-10 i TNF- α , kortykosteronu, białko szoku cieplnego - Hsp 70, katalazy i dysmutazy nadadtlenkowej. W oznaczeniach wykorzystywano zestawy ELISA specyficzne dla drobiu. Wszystkie oznaczenia wykonywano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testów.

3.2.4. Oznaczanie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (T-AOC)

Analizę całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (T-AOC) oparto na zdolności redukcji jonów żelaza w badanej próbce, zgodnie z metodą opisaną przez Benzie i Strain (1996) oraz Katalinic i in. (2005). Mieszaninę reakcyjną przygotowano bezpośrednio przed użyciem, a w jej skład wchodził bufor octanowy (pH 3,6), odczynnik TPTZ (2,4,6-tri-pirydylo-striazyna

Sigma, Poznań, Polska) w stężeniu 40 mmol/l HCl oraz roztwór FeCl_3 w wodzie destylowanej w proporcji 10:1:1. Do 2250 μl mieszaniny reakcyjnej dodawano 25 μl badanej próbki i mierzono absorbancję przy długości fali 593 nm. Drugi odczyt absorbancji wykonywano po 10 minutach inkubacji w temp. pokojowej. Różnicę absorbancji pomiędzy czasem 0 i 10 minutą porównywano z krzywą standardową przygotowaną dla 10 różnych rozcieńczeń Fe(II) , w zakresie od 0 do 1000 $\mu\text{mol/l}$. Uzyskane wyniki badań przeliczano na zawartość białka w próbce i wyrażano jako wartość $\mu\text{mol/g}$ białka w homogenacie tkankowym.

3.2.5. Ocena stężenia białka

Stężenie białka w próbkach z grup doświadczalnych i kontrolnej oznaczano metodą biuretową z użyciem zestawów komercyjnych (Cormay, Łomianki, Polska), zgodnie z metodą opisaną przez Gornala i in. (1949).

3.2.6. Ocena stężenia grup sulfhydrylowych (SH)

Stężenie grup sulfhydrylowych (SH) w próbkach z grup doświadczalnych i kontrolnej określano metodą spektrofotometryczną, zgodnie z metodą opisaną przez Rice-Evans i in. (1991).

3.2.7. Ocena stężenia mostków bityrozynowych

Stężenie mostków bityrozynowych oznaczano metodą spektrofluorymetryczną opisaną przez Rice-Evans i in. (1991). Próbki z grup doświadczalnych i kontrolnej rozcieńczano w 0,9% NaCl. Fluorescencję wzbudzano światłem o długości fali 325 nm, a emisję mierzono przy długości fali 410 nm. Wyniki wyrażano jako wartość $\mu\text{g/mg}$ białka w homogenacie tkankowym.

3.2.8. Ocena stężenia formylokinureniny

Stężenie formylokinureniny oznaczano spektrofluorymetrycznie zgodnie z metodą opisaną przez Rice-Evans i in. (1991). Wyniki wyrażono jako wartość $\mu\text{g/mg}$ białka w homogenacie tkankowym.

3.2.9. Ocena stężenia wodoronadtlenków

Stężenie wodoronadtlenków w próbkach z grup doświadczalnych i kontrolnej oznaczano zgodnie z metodą opisaną przez Albertiego i in. (2000). Wyniki przeliczano na zawartość białka w próbce i wyrażono jako wartość $\mu\text{mol/g}$ białka w homogenacie tkankowym.

3.2.10. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzano przy wykorzystaniu oprogramowania Statistica 13.2 PL (StatSoft, Kraków, Polska). Ze względu na odchylenie od rozkładu normalnego gradient danych weryfikowano testem Shapiro-Wilka. Istotność różnic statystycznych ($p < 0,05$) określano za pomocą testów nieparametrycznych. Porównania między grupami I–IV przeprowadzano z wykorzystaniem analizy wariancji Kruskala-Wallisa jako nieparametrycznego odpowiednika jednokierunkowej analizy wariancji i testów post-hoc. Do sprawdzenia różnic w obrębie tej samej grupy w różnych terminach badania, tj. po 12 godz. od wyklucia i po 7 dniach, zastosowano test U Manna-Whitneya.

Wyniki badań przedstawiono w formie graficznej i tabelarycznej. Te same oznaczenia literowe oznaczają brak istotnych różnic statystycznych. Wielkie litery oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami (test U), a małe – różnice wykazane w analizie wariancji Kruskala-Wallisa i testach post-hoc.

Praca III

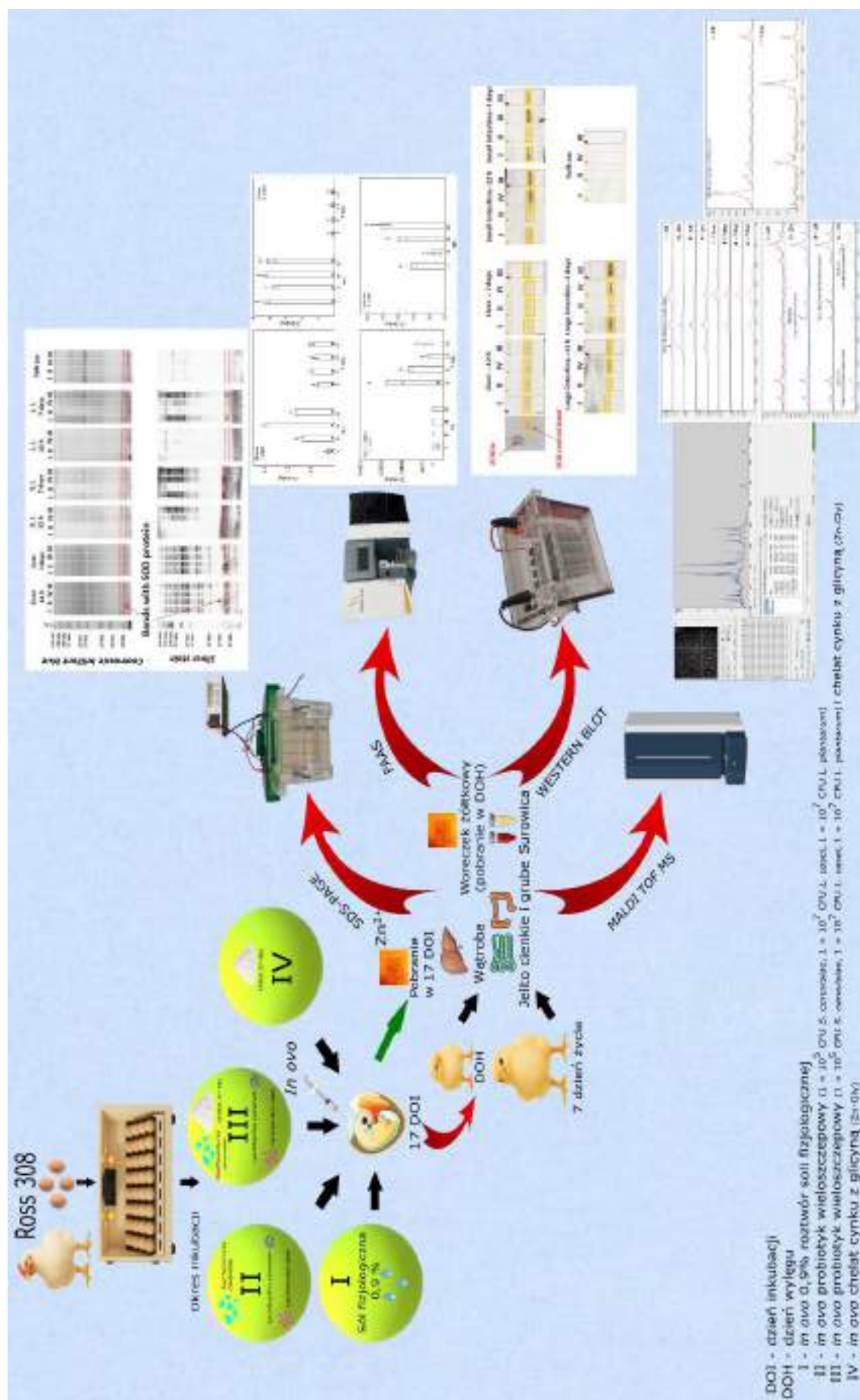
3.3. *“Proteome Changes and Zn Concentration in Chicken Serum and Tissues Following in ovo Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate (Zn-Gly) – Preliminary Research”*

3.3.1. *Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchowu ptaków*

Okres inkubacji i schemat podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchowu ptaków zostały opisane w punkcie 1 w Pracy I.

Schemat realizacji doświadczenia przedstawia rycina 3.

Rycina 3. Schemat realizacji doświadczenia (Praca III)



3.3.2. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobierana w 12 godz. po wykluciu od piskląt uśmierconych przez dekapitację oraz w 7 dniu po wykluciu, z żyły skrzydłowej kurcząt. Krew pobierano do probówek podciśnieniowych typu Vacuette z aktywatorem wykrzepiania i separacji surowicy (Medlab Products, Poland). Próbkę krwi pobierano od 3 ptaków z każdego powtórzenia (łącznie 30 próbek) w każdej grupie doświadczalnej i grupie kontrolnej. Próbek krwi nie pulowano. Próbkę krwi transportowano do laboratorium w temperaturze +4°C w ciągu 1 godziny i wirowano w temperaturze pokojowej (20–22°C) przez 15 minut przy 1000g. Uzyskane próbki surowicy przechowywano do dalszej analizy w temperaturze –80°C.

Analogicznie do krwi, w tych samych punktach czasowych, tj. 12 godz. i w 7 dniu po wylęgu, pobierano do analiz wątrobę, jelito cienkie (jelito biodrowe) oraz jelito grube (odcinek między kloaką i ujściem jelit ślepych) w celu oznaczenia stężenia cynku i przeprowadzenia analizy proteomicznej. Dodatkowo, 12 godzin po wylęgu pobierano woreczek żółtkowy. Tkanki pobierano natychmiast po dekapitacji. Po pobraniu tkanki przepłukiwano zimnym buforem soli fizjologicznej (87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgSO₄, 25 mM glukozy, 75 mM sacharozy, pH 7,4) i przechowywano w temp. –80 °C do dalszych analiz.

3.3.3. Oznaczanie stężenia cynku w surowicy i tkankach kurcząt metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS)

Stężenie cynku oznaczano w 12 godz. po wykluciu i w 7 dniu życia w próbkach wątroby, jelita cienkiego (jelita biodrowego) i surowicy kurcząt z grupy kontrolnej (I) i grup doświadczalnych (II–IV). Stężenie Zn w woreczku żółtkowym oznaczano również w 17 dniu inkubacji jaj i w 12 godz. po wylęgu we wszystkich grupach. Stężenie cynku oznaczano metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS) w urządzeniu Varian SpektrAA 280FS, Belrose, Australia, wyposażonym w autosampler SPS-3 i rozcieńczalnik SIPS, z zastosowaniem płomienia acetylenowo-powietrznego. Szczegółowe parametry walidacyjne wykorzystanej metody badań zamieszczono w tekście pracy.

3.3.4. Analiza profilu peptydowego metodą MALDI–TOF MS

Homogenaty tkankowe wątroby, jelita cienkiego, jelita grubego i woreczka żółtkowego ptaków z grupy kontrolnej i grup doświadczalnych (II–IV) przygotowywano poprzez krótką

homogenizację badanych narządów w łaźni lodowej z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz (Mass Spectrometry Safe Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Homogenaty wirowano przy 5000g przez 20 min w temp. 4 °C, a po odwirowaniu zebrano supernatanty. Oczyszczanie i zagęszczanie supernatantów prowadzono za pomocą ZipTip z żywicą C18 (0,6 µL), stosując 100% acetonitryl (ACN) jako roztwór zwilżający i 0,1% kwas trifluorooctowy (TFA) oraz 50% ACN w stosunku objętościowym 1:1, do eluowania. Eluat nanoszono na płytkę Anchor Chip MALDI (Bruker, Brema, Niemcy) i pokrywano 1 µl matrycy będącej kwasem α -cyano-4-hydroksycynamonowym (HCCA, Bruker, Brema, Niemcy). Równocześnie na pola kalibracyjne nanoszono roztwór wzorcowy (Peptide Calibration Standard II, Bruker, Brema, Niemcy). Widma mas rejestrowano spektrometrem Ultraflextreme MALDI TOF/TOF (Bruker, Brema, Niemcy) w trybie liniowym dla mas > 5000 Da przy parametrach detektora: bramka detektora liniowego 26×2998 V, częstotliwość 1000 Hz, 2 Gs/s, zakres mas 4000–20 000 m/z) i w trybie reflektora dla mas niższych przy parametrach reflektora: bramka detektora $8,8 \times 2531$ V, częstotliwość 1000 Hz, 4 Gs/s, zakres mas 700–4000 m/z). Wszystkie widma poddawano wygładzaniu i korygowano linię bazową przy użyciu oprogramowania flexAnalysis 3.0 (Bruker, Brema, Niemcy). Uzyskane masy peptydów i białek porównywano między sobą oraz danymi zawartymi w bazie UniProt.

3.3.5. Analiza SDS-PAGE

Elektroforezę SDS-PAGE przeprowadzano zgodnie ze standardową procedurą opisaną przez Laemmli (1970). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w żelu rozdzielającym 10% w buforze Tris–HCl, pH 8,8. Jako żel zagęszczający zastosowano mieszaninę poliakrylamidu 4% w buforze Tris–HCl, pH 6,8. Jako bufor komorowy zastosowano Tris–glicynę. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy stałym natężeniu prądu 100 mA.

Do oznaczania mas cząsteczkowych stosowano marker (Perfect™ Color Protein Ladder, EurX, Gdańsk, Polska) w zakresie 7–240 kDa. Żele barwiono błękitem Coomassie (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) i azotanem srebra. Obrazowanie żeli przeprowadzano wykorzystując skaner – ImageScanner III z oprogramowaniem LabScan 6.0 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

3.3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań przeprowadzano przy użyciu oprogramowania Statistica 13.2 PL (StatSoft, Kraków, Polska). Ze względu na odchylenie od rozkładu

normalnego gradient danych weryfikowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku braku rozkładu normalnego danych w celu normalizacji rozkładu i uzyskania jednorodności wariancji przeprowadzano transformację Box–Coxa. Wyniki przedstawiano jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

Do oceny istotności różnic ($p < 0,05$) pomiędzy grupą kontrolną (I) i grupami doświadczalnymi (II–IV) zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya. Test t-Studenta zastosowano do oceny różnic w obrębie tej samej grupy w terminie badania w 12 godz. po wykluciu i w 7 dniu życia.

Do oceny wpływu badanych związków, tj. probiotyku wieloszczepowego i/lub chelatu Zn-Gly na średnie stężenie Zn w surowicy i wybranych tkankach zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Efekty interakcji badanych związków oceniano przy użyciu współczynnika η^2 (eta), określającego jaka część całkowitej zmienności wyników jest przez nie determinowana (efekty stałe modelu) i obliczanego według wzoru:

$$\eta^2 = SS_{\text{efekt}}/SS_{\text{total}} \times 100\%,$$

gdzie: SS_{efekt} – suma kwadratów odchylen związanych z efektem, SS_{total} – całkowita suma kwadratów dla efektów + błąd.

Wyniki przedstawiono w pracy w formie graficznej. Te same oznaczenia literowe wskazują na brak istotnych różnic statystycznych. Wielkie litery oznaczają różnice między grupami w czasie (test t), a małe litery – różnice wykazane testem ANOVA i testami post hoc.

Miarę intensywności pasm SOD przedstawiano w postaci średnich arytmetycznych i odchylenia standardowego $\pm$ SD. Analizę wariancji (ANOVA) i test HSD Tukeya zastosowano do oceny istotności różnic pomiędzy grupami ($p \leq 0,05$). Test t-Studenta ($p \leq 0,05$) wykorzystano do porównania średniej intensywności pasma w danym narządzie w 12 godz. i 7 dniu życia.

Praca IV

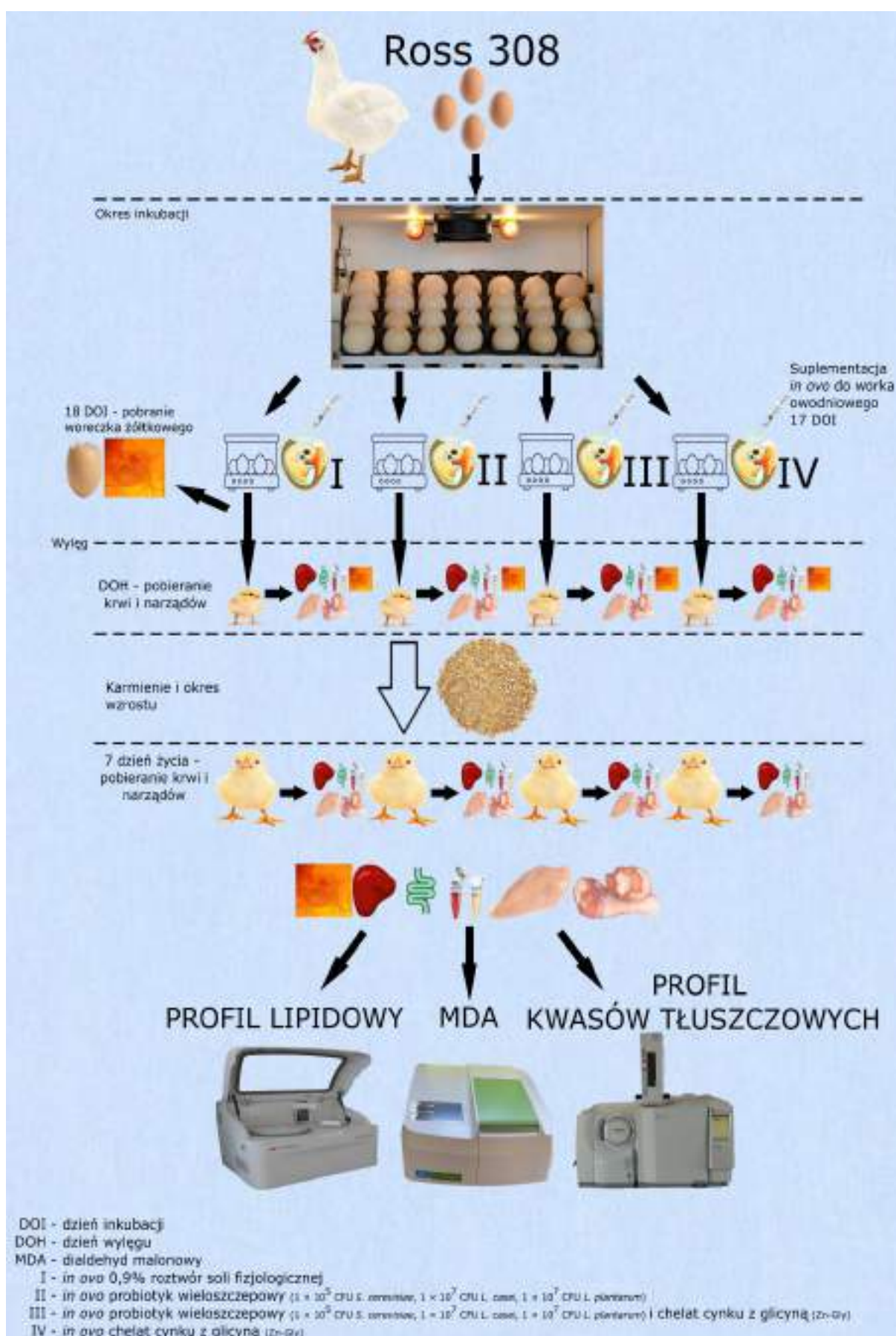
3.4. “Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens”

3.4.1. Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchowu ptaków

Okres inkubacji i schemat podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly oraz warunki utrzymania i odchowu ptaków zostały opisane w punkcie 1 w Pracy I.

Schemat realizacji doświadczenia przedstawia rycina 4.

Rycina 4. Schemat realizacji doświadczenia (Praca IV)



3.4.2. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobierana w dniu wylęgu (DOH), przed podaniem paszy i wody, od piskląt uśmierconych poprzez dyslokację kręgosłupa w odcinku szyjnym, zgodnie z opisem Murphy i in. (2016) oraz w 7 dniu po wykluciu, z żyły skrzydłowej kurcząt. Krew pobierano do probówek podciśnieniowych typu Vacuette z aktywatorem wykrzepiania i separacji surowicy (Medlab Products, Poland). Próbkę krwi pobierano od 3 ptaków z każdego powtórzenia (łącznie 30 próbek) w każdej grupie doświadczalnej i grupie kontrolnej. Próbek krwi nie łączono. Próbkę krwi transportowano do laboratorium w temperaturze +4°C w ciągu 1 godziny i wirowano w temp. pokojowej (20–22°C) przez 15 minut przy 1000g. Użyte próbki surowicy przechowywano do dalszej analizy w temperaturze –80°C.

Analogicznie do krwi, w tych samych punktach czasowych, tj. w dniu wylęgu i w 7 dniu po wylęgu pobierano do analiz wątrobę, jelito cienkie (jelito biodrowe) mięsień piersiowy i mięsień udowy. Dodatkowo, w dniu wylęgu pobierano od kurcząt woreczek żółtkowy. Tkanki przechowywano do dalszych analiz w temperaturze –80 °C.

3.4.3. Analiza składu i zawartości kwasów tłuszczowych

Skład i zawartość kwasów tłuszczowych w badanych tkankach kurcząt oznaczano metodą chromatografii gazowej przy użyciu chromatografu INCO 505 (Praga, Czechy) z wykorzystaniem mieszaniny standardów Supelco 37-Component FAME MIX i Linolenic Acid Methyl Ester Isomer Mix (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Ekstrakcję lipidów prowadzono metodą Folcha w ekstraktorze Velp SER 148 (Velp, Włochy) według metody opisanej przez Kwiecień i in., (2015). Zawartość kwasów tłuszczowych wyrażano jako procent całkowitej ilości zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych, klasyfikując je jako kwasy nasycone (SFA), jednonienasycone (MUFA) i wielonienasycone (PUFA). Ponadto, w badaniach obliczano wskaźnik miażdżycowy (AI) i wskaźnik trombogenności (TI), według Ulbricht i Southgate (1991) oraz proporcję hipocholesterolemicznych/hipercholesterolemicznych kwasów tłuszczowych (h/H), według Fernández i in. (2007) stosując następujące wzory:

$$AI = (C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / [\sum MUFA + \sum(n-6) + \sum(n-3)]$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / [(0.5 \times \sum MUFA + 0.5 \times \sum(n-6) + 3 \times \sum(n-3)) + (\sum(n-3) / \sum(n-6))]$$

$$h/H = (C18:1 \text{ n-9} + C18:2 \text{ n-6} + C20:4 \text{ n-6} + C18:3 \text{ n-3} + C20:5 \text{ n-3} + C22:5 \text{ n-3} + C22:6 \text{ n-3}) / (C14:0 + C16:0)$$

3.4.4. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w surowicy i tkankach

Stężenie MDA w homogenatach tkanek oznaczano metodą kolorymetryczną poprzez pomiar absorbancji w warstwie butanolowej zawierającej kompleks TBA-MDA (kwas tiobarbiturowy-dialdehyd malonowy) przy długości fali 552 nm, zgodnie z metodą opisaną przez Wójcik i in. (2005). Stężenie MDA w surowicy oznaczano metodą spektrofotometryczną wg metody opisanej przez Wessely-Szponder i in. (2015). Do oznaczenia stężenia MDA wykorzystywano krzywą wzorcową przygotowaną z użyciem bis-dimetyloacetalu dialdehydu malonowego. Dodatkowo, w tkankach oznaczano stężenie białka metodą Lowry'ego według Maehre i in. (2018). Uzyskane wyniki badań przedstawiono graficznie w tekście pracy.

Ponadto, w 24 godz. po suplementacji *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i/lub chelatem Zn-Gly (18 DOI), pobierano woreczki żółtkowe od trzech zarodków z każdego powtórzenia w grupie kontrolnej i w grupach doświadczalnych (30 próbek w każdej grupie) w celu oznaczenia stężenia MDA i białka.

3.4.5. Analiza parametrów biochemicznych

W dniu wylęgu (DOH) i w 7 dniu życia piskląt oznaczano w surowicy następujące parametry biochemiczne: ALAT – aminotransferaza alaninowa; ASPAT – aminotransferaza asparaginianowa; BIL D – bilirubina bezpośrednia; BIL T – bilirubina całkowita; CHOL – cholesterol; GGT – gamma-glutamylotranspeptydaza; HDL D – lipoproteiny o dużej gęstości, frakcja bezpośrednia; LDL D – lipoproteiny o małej gęstości, frakcja bezpośrednia; LIPASE – lipaza; TG – trójglicerydy; TP – białko całkowite; BILE ACID – kwasy żółciowe; LDH – dehydrogenaza mleczanowa i AMY – amylaza. Do wykonania oznaczeń wykorzystywano komercyjne zestawy (PZ Cormay S.A., Ursynów Business Park, Warszawa, Polska) i procedurę rekomendowaną przez producenta testów. Badania wykonywano przy użyciu automatycznego analizatora biochemicznego Accent S120 (PZ Cormay S.A., Warszawa, Polska).

3.4.6. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddawano analizie statystycznej po wcześniejszej weryfikacji normalności rozkładu danych, testem Shapiro–Wilka i jednorodności wariancji, testem Levene'a. Do oceny wyników badań wykorzystywano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Średnie zawartości kwasów tłuszczowych porównywano testem Tukeya, natomiast średnie wartości MDA i albuminy analizowano przy użyciu nieparametrycznego testu Kruskala–Wallisa. Wyniki zaprezentowano w formie graficznej i tabelarycznej. Analizę statystyczną prowadzono w programie Statistica 13.2 (StatSoft, Kraków, Polska).

Praca V

3.5. *“Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks”*

3.5.1. *Badania eksperymentalne - okres inkubacji i schemat podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly*

Okres inkubacji i schemat podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu Zn-Gly zostały opisane w punkcie 1 w Pracy I.

Schemat realizacji doświadczenia przedstawia rycina 5.

3.5.2. Warunki utrzymania i odchowu ptaków

Wszystkie ptaki po wykluciu poddawano seksowaniu, a następnie do dalszych etapów badań wybrano z każdej grupy losowo 150 jednodniowych kurcząt płci męskiej. Każda grupa doświadczalna (II-IV) i kontrolna (I) została podzielona na 10 powtórzeń, po 15 ptaków na powtórzenie (150 ptaków/grupę). Doświadczenie, trwające 42 dni, przeprowadzono w Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w ściśle kontrolowanych warunkach środowiskowych i zgodnie z zaleceniami dla tej linii kurcząt (Aviagen, *Ross Broiler Management Handbook*, Ross 308/308 FF Broiler: *Performance Objectives*).

Ptaki odchowywano na wiórach drzewnych w kojcach o wymiarach $1,2 \times 0,8$ m. Kojce wyposażone były w automatyczne linie karmienia i poidła smoczkowe. Przez pierwsze trzy dni odchowu temperatura w pomieszczeniu doświadczalnym utrzymywana była w granicach $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a następnie sukcesywnie obniżana o 3°C tygodniowo, aż do osiągnięcia temp. $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Program świetlny obejmował 24 godziny dostępu światła przez pierwsze 10 dni, a następnie 19 godzin światła i 5 godzin ciemności. Wilgotność względna (RH) utrzymywana była stale na poziomie $60\% \pm 10\%$. Wodę i paszę podawano ptakom *ad libitum* przez cały okres doświadczenia. Ptaki karmiono dietą podstawową nie zawierającą kokcydiostatyków i antybiotyków. Pasza podstawowa została opracowana zgodnie z zaleceniami żywieniowymi dla kurcząt brojlerów rasy Ross 308 (Aviagen, *Broiler Nutrition Specifications*).

3.5.3. Pobieranie krwi i tkanek kurcząt

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobierana w dniu wylęgu (DOH) od piskląt uśmierconych przez dyslokację kręgosłupa w odcinku szyjnym oraz w 7 dniu po wykluciu, z żyły skrzydłowej kurcząt. Krew pobierano do probówek podciśnieniowych typu Vacuette z aktywatorem wykrzepiania i separacji surowicy (Medlab Products, Poland). Próbkę krwi pobierano od 3 ptaków z każdego powtórzenia (łącznie 30 próbek) w każdej grupie doświadczalnej i grupie kontrolnej. Próbek krwi nie łączono. Próbkę krwi transportowano do laboratorium w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ w ciągu 1 godziny i wirowano w temperaturze pokojowej ($20\text{--}22^{\circ}\text{C}$) przez 15 minut przy 1000g. Uzyskane próbki surowicy przechowywano do dalszej analizy w temperaturze -80°C .

Analogicznie, w tych samych punktach czasowych, tj. w dniu wylęgu (DOH) i 7 w dniu po wylęgu, pobierano tkanki do oceny stężenia cytokin, immunoglobulin i białek ostrej fazy. W dniu wylęgu (DOH) pobierano próbki wątroby, jelita cienkiego, jelita grubego i woreczka

żółtkowego. W 7 dniu życia piskląt pobierano próbki wątroby, jelita cienkiego i grubego. Bezpośrednio po pobraniu tkanki przepłukiwano w roztworze soli fizjologicznej (87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgSO₄, 25 mM glukozy, 75 mM sacharozy, pH 7,4), a następnie przechowywano w temperaturze –80 °C do dalszych analiz. Próbek tkanek nie łączono.

3.5.4. Ocena parametrów produkcyjnych

W 10, 24 i 42 dniu doświadczenia dla każdego powtórzenia i w każdej grupie obliczano średnie przyrosty masy ciała (BWG), spożycie paszy (FI) i współczynnik wykorzystania paszy (FCR). Analizę badanych parametrów przeprowadzano w podziale na trzy etapy żywienia, tj. dla okresu startowego (0–10 dni), okresu wzrostu (10–24 dni) i okresu tuczu (24–42 dni), a także dla całego okresu doświadczenia (0–42 dni). Określono także masę ciała piskląt po wykluciu i współczynnik śmiertelności w całym okresie doświadczenia.

3.5.5. Oznaczanie białek ostrej fazy i immunoglobulin w surowicy i tkankach kurcząt

Do oznaczania haptoglobiny (Hp), alfa-1 kwaśnej glikoproteiny (α -1-AGP), ceruloplazminy (Cp), surowiczego składnika amyloidu A (SAA), lektyny wiążącej mannozę (MBL) i immunoglobulin IgM, IgA i IgY w surowicy i tkankach kurcząt zastosowano komercyjne zestawy ELISA specyficzne dla drobiu. Wszystkie oznaczenia wykonywano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testów.

3.5.6. Oznaczanie stężenia cytokin w surowicy i tkankach kurcząt

Do oznaczania IL-2, IL-12, TNF- α , TGF- β 1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ i IL-1- β w surowicy i tkankach kurcząt zastosowano zestawy ELISA specyficzne dla drobiu. Wszystkie oznaczenia wykonywano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testów.

3.5.7. Analiza masy narządów limfatycznych

Bezpośrednio po pobraniu krwi, w dniu wylęgu (DOH) i w 7 dniu życia, pobierano od kurcząt śledzionę, torbę Fabrycjusza i grasicę. Pobrane narządy oczyszczano z przylegającej tkanki i ważono. Masę narządów wyrażano jako masę względną w odniesieniu do masy ciała.

3.5.8. Analiza ekspresji mRNA immunoglobulin w jelicie biodrowym

Całkowite RNA izolowano z homogenizowanych próbek jelita biodrowego używając zestawu RNeasy Mini (QIAGEN, Crawley, Wlk. Brytania) zgodnie z instrukcją producenta. Jakość i czystość wyizolowanego RNA oceniano za pomocą spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop Technologies, Silverside, Wilmington, DE, USA) przy długości fali 260/280 nm. Odwrotną transkrypcję RNA do cDNA oraz reakcję PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) przeprowadzano z użyciem zestawu SuperScript II First-Strand cDNA Synthesis zgodnie z instrukcją producenta (Invitrogen, Chorzów, Polska). Ekspresję genów immunoglobulin IgA, IgY i IgM oznaczano przy użyciu systemu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Warrington, Wlk. Brytania) zgodnie z procedurą opisaną przez Lammers i in., 2010.

3.5.9. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników badań przeprowadzano z wykorzystaniem programu Statistica 13.2 PL (StatSoft, Kraków, Polska). Istotność różnic między grupą kontrolną (I) i grupami eksperymentalnymi (II–IV) oceniano w dwóch punktach czasowych, tj. w dniu wylęgu (DOH) i 7 dniu życia (zmienne zależne) w odniesieniu do stężeń wybranych cytokin, immunoglobulin, białek ostrej fazy, względnej masy narządów limfoidalnych i wskaźnika ekspresji mRNA immunoglobulin IgA, IgY i IgM w jelicie biodrowym.

Po ocenie rozkładu danych i jednorodności wariancji do porównań między grupami eksperymentalnymi i kontrolną, w danym przedziale czasowym, zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya. Do porównania różnic w obrębie tej samej grupy między dwoma punktami czasowymi zastosowano test t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie i odchylenie standardowe ($\pm$ SD), a różnice uznawano za istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$. Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w postaci tabel.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W opisie wyników badań przyjęto oznaczenia grup, odpowiadające zastosowanej suplementacji *in ovo* tj:

grupa I (kontrolna) - suplementacja *in ovo* jałowego 0,9% roztworu soli fizjologicznej,

grupa II – suplementacja *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego EM (1×10^5 CFU/jajo *Saccharomyces cerevisiae*; 1×10^7 CFU/jajo *Lactobacillus casei*; 1×10^7 CFU/jajo *Lactobacillus plantarum*),

grupa III – suplementacja *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego EM oraz chelatu Zn-Gly (1×10^5 CFU/jajo *Saccharomyces cerevisiae*; 1×10^7 CFU/jajo *Lactobacillus casei*; 1×10^7 CFU/jajo *Lactobacillus plantarum*, 100 µg/jajo Zn-Gly),

grupa IV – suplementacja *in ovo* chelatu Zn-Gly (100 µg/jajo Zn-Gly).

Praca I

4.1. *“Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens”*

4.1.1. *Wpływ suplementacji in ovo na wylęgowość kurcząt brojlerów*

We wszystkich grupach doświadczalnych wykazano niższą wylęgowość w porównaniu z grupą I. Największy spadek wylęgowości stwierdzono w grupie III (83.4%), natomiast w grupie II (90.8%) wartości tego parametru były zbliżone do wyników z grupy I.

4.1.2. *Analiza parametrów produkcyjnych*

W pierwszych 7 dniach odchowu piskląt przyrosty masy ciała (BWG) nie różniły się istotnie między grupą I i grupami doświadczalnymi ($p = 0.0058$), przy czym wskaźnik ten był istotnie niższy w grupie II w porównaniu z grupą III. W odniesieniu do spożycia paszy (FI) istotnie niższe wartości stwierdzono u kurcząt w grupie II w porównaniu z grupą I, III i IV ($p < 0.001$). Współczynnik wykorzystania paszy (FCR) był istotnie niższy w grupie II i III w porównaniu do grupy I, natomiast nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupą IV i grupą I ($p < 0.001$).

4.1.3. Analiza odsetka komórek z ekspresją $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^+$ i $CD25^+$ w krwi obwodowej kurcząt brojlerów

W 12 godzinie po wylęgu odsetek komórek z ekspresją $CD3^+CD4^+$ w grupie III był istotnie wyższy w porównaniu z grupą I i IV ($H = 13.58$; $p < 0.0035$). W 7 dniu życia kurcząt wartości tego parametru w grupach III i IV były istotnie wyższe od uzyskanych w grupie I ($H = 18.30$; $p < 0.0004$).

W 12 godzinie po wylęgu odsetek komórek z ekspresją $CD3^+CD8^+$ był istotnie niższy w grupach II i IV w porównaniu do grupy I ($H = 17.16$; $p < 0.0007$). W 7 dniu życia kurcząt istotny wzrost odsetka $CD3^+CD8^+$ odnotowano w grupie III w porównaniu do grupy I.

Analiza odsetka komórek z ekspresją $CD4^+CD25^+$ wykazała, że w 12 godzinie po wylęgu w grupie I był on istotnie niższy w porównaniu z grupą III ($H = 15.21$; $p < 0.0016$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt istotnie wyższe wartości tego parametru odnotowano w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($H = 17.97$; $p < 0.0004$).

Analiza odsetka komórek z ekspresją $CD25^+$ wykazała, że w 12 godzinie po wylęgu był on istotnie niższy w grupie III w porównaniu do grupy I ($H = 13.80$; $p < 0.0032$). W 7 dniu życia kurcząt wartość tego parametru w grupie III była wyższa w porównaniu do grupy I.

4.1.4. Analiza odsetka komórek z ekspresją $TCR\gamma\delta^+$ i MHC klasy II^+ w krwi obwodowej kurcząt brojlerów

Odsetek komórek z ekspresją $TCR\gamma\delta^+$ w 12 godzinie po wylęgu był istotnie wyższy w grupie IV w porównaniu do grupy III ($H = 15.62$; $p < 0.014$). W 7 dniu życia kurcząt odsetek $TCR\gamma\delta^+$ był istotnie wyższy w grupach III i IV w porównaniu z grupą I ($H = 18.12$; $p < 0.004$). Odsetek komórek z ekspresją MHC klasy II^+ w 12 godzinie po wylęgu był istotnie wyższy w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($H = 19.45$; $p < 0.0002$). W 7 dniu życia kurcząt wartości tego parametru były istotnie wyższe w grupie III w porównaniu z grupą I oraz w grupie III w porównaniu do grupy IV.

4.1.5. Analiza odsetka komórek z ekspresją $Bu-1A^+$, $CD79A^+$ i monocytów/makrofagów $KUL01^+$ w krwi obwodowej kurcząt brojlerów

W 12 godzinie po wylęgu średni odsetek komórek z ekspresją $Bu-1A^+$ był istotnie wyższy w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($p < 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt odsetek ten był istotnie wyższy w grupie III w porównaniu z grupą I ($H = 18.41$; $p < 0.0004$).

Analiza odsetka komórek z ekspresją CD79A⁺ wykazała, że w 12 godzinie po wylęgu był on istotnie wyższy w grupie I w porównaniu do grupy IV ($H = 19.57$; $p < 0.0002$), natomiast nie wykazano różnic pomiędzy grupą I i grupami II i III. W 7 dniu życia kurcząt wartości odsetka CD79A⁺ nie różniły się istotnie między grupami doświadczalnymi i grupą I ($H = 8.40$; $p < 0.038$).

W 12 godzinie po wylęgu średni odsetek komórek z ekspresją KUL01⁺ w grupie III (33.73%) był istotnie wyższy w porównaniu do grupy I ($H = 20.22$; $p < 0.0002$). W 7 dniu życia kurcząt wartości tego parametru w grupach III (29.55%) i IV (25.16%) były istotnie wyższe w porównaniu do grupy I ($H = 21.13$; $p < 0.0001$).

4.1.6. Analiza odsetka komórek z ekspresją CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺ i CD25⁺ w śledzionie kurcząt brojlerów

W 12 godzinie po wylęgu nie wykazano istotnych różnic w odsetku komórek z ekspresją CD3⁺CD4⁺ między grupą I i grupami doświadczalnymi. W grupie IV wartości tego parametru były statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II i III ($H = 17.55$; $p < 0.0005$). W 7 dniu życia kurcząt odsetek CD3⁺CD4⁺ w grupach II i III był istotnie niższy w porównaniu do grupy I ($H = 20.57$; $p < 0.0001$).

Analiza odsetka komórek z ekspresją CD3⁺CD8⁺ w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że w grupie III wartości tego parametru były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z grupą I i grupą IV ($H = 15.26$; $p < 0.0016$). W 7 dniu życia kurcząt odsetek tych komórek był istotnie niższy w grupach II i III w porównaniu do grupy I ($H = 20.51$; $p < 0.0001$).

Analiza odsetka komórek z ekspresją CD4⁺CD25⁺ w śledzionie w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że był on istotnie wyższy w grupie III w porównaniu z grupą I ($H = 19.55$; $p < 0.0002$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie niższe wartości tego parametru stwierdzono w grupie I w porównaniu do grupy III i IV.

W 12 godzinie po wylęgu odsetek komórek z ekspresją CD25⁺ w grupie I był statystycznie istotnie wyższy od wartości uzyskanych w grupach III i IV ($H = 15.26$; $p < 0.0016$). W 7 dniu życia kurcząt odsetek komórek z ekspresją CD25⁺ był natomiast istotnie niższy w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($H = 20.51$; $p < 0.001$).

4.1.7. Analiza odsetka komórek z ekspresją TCRγδ⁺ i MHC klasy II⁺ w śledzionie kurcząt brojlerów

W 12 godzinie po wylęgu odsetek komórek TCRγδ⁺ był istotnie niższy w grupie II w porównaniu z grupą I ($H = 21.05$; $p < 0.001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt wartości tego

parametru we wszystkich grupach doświadczalnych były zbliżone i nie różniły się istotnie od odnośnych wartości w grupie I ($H = 6.45$; $p < 0.09$). Analiza odsetka komórek z ekspresją receptora MHC klasy II⁺ w śledzienie w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że był on istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy I ($H = 17.99$; $p < 0.0004$). Odmienne wyniki uzyskano w badaniu w 7 dniu życia kurcząt, w którym w grupie II odsetek tych komórek był statystycznie istotnie niższy w porównaniu do grupy I ($H = 21.60$; $p < 0.0001$).

4.1.8. Analiza odsetka komórek z ekspresją Bu-1A⁺, CD79A⁺ i monocytów/makrofagów KUL01⁺ w śledzienie kurcząt brojlerów

W 12 godzinie po wylęgu odsetek komórek z ekspresją Bu-1A⁺ był istotnie wyższy w grupach II (8.95%) i III (10.13%) w porównaniu z grupą I ($p < 0.0013$). W 7 dniu życia kurcząt odsetek tych komórek był istotnie wyższy w grupie III w porównaniu do w grupy I ($H = 17.55$; $p < 0.0005$). Odsetek komórek z ekspresją CD79A⁺ w 12 godzinie po wylęgu był w grupach doświadczalnych porównywalny z grupą I ($H = 0.33$; $p < 0.95$), a w 7 dniu życia kurcząt był statystycznie istotnie niższy w grupie III (5.67%) w porównaniu do grupy I ($H = 20.51$; $p < 0.0001$).

W 12 godzinie po wylęgu odsetek komórek z ekspresją KUL01⁺ w grupach III (71.33%) i IV (62.20%) był istotnie wyższy w porównaniu do grupy I ($H = 21.60$; $p < 0.0001$). W 7 dniu życia kurcząt odsetek tych komórek był istotnie wyższy w grupach II (88.0%) i IV (62.20%) w porównaniu do grupy I i III ($H = 18.69$; $p < 0.0003$).

Praca II

4.2. *“Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks”*

4.2.1. *Analiza aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) w surowicy i tkankach piskląt*

Aktywność SOD w surowicy w 12 godzinie po wylęgu była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast pomiędzy 12 h po wylęgu i 7 dniem życia kurcząt aktywność SOD była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt aktywność SOD w wątrobie była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu wyższe wartości badanego parametru stwierdzono w grupie II w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt aktywność SOD była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$). Analiza aktywności SOD w jelicie grubym w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że była ona statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$) oraz w grupie III w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wyższe wartości tego parametru stwierdzono w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu aktywność SOD była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$).

Aktywność katalazy (CAT) w surowicy w 7 dniu życia kurcząt była wyższa w grupach II i IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu aktywność katalazy była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Analiza aktywności CAT w jelicie grubym w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że była ona statystycznie istotnie wyższa w grupach I i III w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$), a 7 dniu życia kurcząt w grupie III w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu aktywność CAT była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$).

4.2.2. Analiza stężenia cytokin *TNF-α*, *IFN-γ* i *IL-10* w surowicy i tkankach kurcząt

Średnie stężenie *TNF-α* w surowicy w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupach I i IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie *TNF-α* w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupach I, III i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W wątrobie w 12 godzinie po wylęgu stężenie badanego parametru było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt jego stężenie w wątrobie było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim stężenie *TNF-α* w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupach I i IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia tej cytokiny w jelicie grubym w 7 dniu życia kurcząt wykazała, że było ono statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W woreczku żółtkowym stężenie *TNF-α* było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$).

Stężenie *IFN-γ* w surowicy w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia statystycznie istotnie wyższe w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia badanego parametru w wątrobie w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że było ono statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim stężenie *IFN-γ* w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupach I i IV w porównaniu z grupą III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie *IFN-γ* w jelicie cienkim było statystycznie istotnie wyższe w grupach I i II w porównaniu z grupą IV ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym statystycznie istotnie wyższe stężenie *IFN-γ* wykazano w 12 godzinie po wylęgu i w 7 dniu życia kurcząt w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). Stężenie *IFN-γ* w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie wyższe w grupie II i IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$).

Statystycznie istotnie wyższe stężenie *IL-10* w surowicy wykazano w 12 godzinie po wylęgu w grupie II w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$). W wątrobie w 12 godzinie po wylęgu stężenie badanego parametru było statystycznie istotnie wyższe w grupach I i II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie tego parametru w wątrobie było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu z grupą III ($p \leq 0.05$). Stężenie *IL-10* w jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupie III

w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-10 w jelicie cienkim było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-10 w jelicie grubym w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie niższe w grupach I i II w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$).

4.2.3. Analiza stężenia kortykosteronu (CORT) w surowicy i tkankach kurcząt

Statystycznie istotnie wyższe stężenie CORT wykazano w surowicy w 12 godzinie po wylęgu w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$) oraz w 7 dniu życia kurcząt w grupie IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W wątrobie, w 12 godzinie po wylęgu, stężenie CORT było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia tego parametru w jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że było ono statystycznie istotnie wyższe w grupach III i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym w 12 godzinie po wylęgu stężenie CORT było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu stężenie CORT było statystycznie istotnie niższe w grupie II w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$).

4.2.4. Analiza stężenia białka szoku cieplnego (Hsp70) w surowicy i tkankach kurcząt

Stężenie Hsp70 w surowicy w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia Hsp70 w wątrobie wykazała statystycznie istotnie niższe stężenie tego parametru w 12 godzinie po wylęgu w grupach II i III w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$) oraz w grupie III w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$). Statystycznie istotnie wyższe stężenie Hsp70 wykazano również w jelicie grubym w 12 godzinie po wylęgu w grupie IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe stężenie Hsp70 w jelicie grubym wykazano w grupie IV w porównaniu z grupą III ($p \leq 0.05$).

4.2.5. Analiza całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (T-AOC), stężenia białka, grup sulfhydrylowych (–SH), mostków bityrozynowych, formylokinureniny oraz wodoronadtlenków (DEPPD) w surowicy i tkankach kurcząt

W 12 godzinie po wylęgu w surowicy stwierdzono statystycznie istotnie wyższe T-AOC w grupie III w porównaniu do grupy IV ($p < 0.0001$). W 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe T-AOC wykazano w surowicy w grupie II w porównaniu do grupy I ($p < 0.05$). W wątrobie statystycznie istotnie wyższe T-AOC w 7 dniu życia kurcząt stwierdzono w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p < 0.001$). W mięśniu piersiowym w 12 godzinie po wylęgu wskaźnik T-AOC był statystycznie istotnie wyższy w grupie IV w porównaniu do grupy II i III ($p < 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższy w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p < 0.0001$). Analiza T-AOC w sercu wykazała, że w 12 godzinie po wylęgu był on statystycznie istotnie wyższy w grupie III w porównaniu do grupy IV ($p < 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższy w grupie I w porównaniu do grupy III ($p < 0.05$). W jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu T-AOC był statystycznie istotnie wyższy w grupach II i III w porównaniu do grupy I i IV ($p < 0.0001$). W woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu T-AOC był statystycznie istotnie wyższy w grupie II i IV w porównaniu z grupą I ($p < 0.001$).

W 12 godzinie po wylęgu stężenie białka w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.001$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie białka w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy I ($p < 0.05$). W wątrobie w 12 godzinie po wylęgu stężenie białka było statystycznie istotnie wyższe w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.0001$). Analiza stężenia białka w mięśniu piersiowym w 12 h po wylęgu wykazała, że było ono statystycznie istotnie niższe w grupach I i IV w porównaniu do grupy II i III ($p < 0.0001$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie białka w mięśniu piersiowym było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.0001$). W sercu stężenie białka w 12 godzinie po wylęgu było statystycznie istotnie wyższe w grupach I i III w porównaniu do grupy II ($p < 0.001$), a w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.001$). Analiza stężenia białka w jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że było ono statystycznie istotnie niższe w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie białka w jelicie cienkim było statystycznie istotnie wyższe w grupach II i III

w porównaniu do grupy IV ($p < 0.001$). Stężenie białka w woreczku żółtkowym różniło się istotnie statystycznie w grupie IV w porównaniu z grupą I ($p < 0.0001$).

Statystycznie istotne różnice w zawartości grup SH wykazano w surowicy w 12 godzinie po wylęgu. W grupach I i II była ona statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt zawartość grup SH w surowicy była statystycznie istotnie wyższa w grupach I i IV w porównaniu do grupy II i III ($p < 0.001$). Analiza zawartości grup SH w wątrobie w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że była ona statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy II i IV ($p < 0.0001$), a w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p < 0.001$). Zawartość grup SH w mięśni piersiowym w 12 godzinie po wylęgu była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.001$). W jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu zawartość tych grup była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($p < 0.0001$). W woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu zawartość grup SH była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.001$).

W 12 godzinie po wylęgu zawartość mostków bityrozynowych w surowicy była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy III ($p < 0.05$), natomiast w wątrobie istotnie wyższa w grupach I i II w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.0001$). W 7 dniu życia kurcząt zawartość mostków bityrozynowych w wątrobie była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do grupy II i IV ($p < 0.0001$). Analiza zawartości mostków bityrozynowych w mięśni piersiowym w 7 dniu życia kurcząt wykazała, że była ona statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu z grupą I ($p < 0.05$). W sercu w 12 godzinie po wylęgu zawartość mostków bityrozynowych była statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy II ($p < 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt istotnie niższa w grupach II i III w porównaniu z grupą IV ($p < 0.0001$). W jelicie cienkim w 12 godzinie po wylęgu zawartość mostków bityrozynowych była statystycznie istotnie niższa w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p < 0.0001$). W woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu zawartość mostków bityrozynowych była statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy III ($p < 0.001$).

W 12 godzinie po wylęgu średnia zawartość formylokinureny w wątrobie była statystycznie istotnie niższa w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.0001$). Analiza zawartości formylokinureny w 12 godz. po wylęgu w jelicie cienkim wykazała, że była ona statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.0001$). W woreczku żółtkowym wartość badanego parametru była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w po-

równaniu do grupy I ($p < 0.001$). W 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotne różnice w wartościach tego parametru wykazano we wszystkich badanych tkankach z wyjątkiem mięśnia piersiowego. Zawartość metabolitu w surowicy była statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.05$). W komórkach wątroby zawartość formylokinureny była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy II i IV ($p < 0.001$) oraz w grupie II w porównaniu do grupy IV ($p < 0.0001$). Zawartość tego związku w sercu była natomiast statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu z grupą III i IV ($p < 0.0001$). Średnia zawartość formylokinureny w jelicie cienkim w 7 dniu życia kurcząt była statystycznie istotnie niższa w grupie III w porównaniu do grupy I i IV ($p < 0.0001$).

W 12 godzinie po wylęgu zawartość DEPPD w surowicy była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.001$). Analiza stężenia tego związku w wątrobie w 7 dniu życia kurcząt wykazała statystycznie istotnie wyższą zawartość DEPPD w grupach I i II w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.0001$). W mięśniu piersiowym w 12 godzinie po wylęgu zawartość DEPPD była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p < 0.0001$). Statystycznie istotnie niższą zawartość DEPPD w sercu wykazano w 12 godzinie po wylęgu w grupie I w porównaniu do grupy IV ($p < 0.001$) oraz w 7 dniu życia kurcząt w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p < 0.001$). W jelicie cienkim w 7 dniu życia kurcząt zawartość DEPPD była statystycznie istotnie wyższa w grupach IV i I w porównaniu do grupy III ($p < 0.0001$). Statystycznie istotnie wyższą zawartość DEPPD w woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu wykazano w grupie I w porównaniu do grupy III i IV ($p < 0.0001$).

Praca III

4.3. “Proteome Changes and Zn Concentration in Chicken Serum and Tissues Following in ovo Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate (Zn-Gly) – Preliminary Research”

4.3.1. Analiza stężenia Zn w surowicy i tkankach kurcząt

Statystycznie istotnie wyższe stężenie Zn w surowicy w 12 godzinie po wylęgu wykazano w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wykazano statystycznie istotnie niższe stężenie Zn w grupie I w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$).

Analiza stężenia Zn w wątrobie w 12 godzinie po wylęgu wykazała, że było ono statystycznie istotnie niższe w grupie II w porównaniu z grupą III i I ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe stężenie Zn wykazano w grupach IV i III w porównaniu do grupy II i I ($p \leq 0.05$). Statystycznie istotnie wyższe stężenie Zn w jelicie cienkim wykazano w 7 dniu życia kurcząt w grupie I w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$).

W 17 dniu inkubacji stężenie Zn w woreczku żółtkowym, przed suplementacją *in ovo*, wynosiło $27,8 \pm 0,79$ mg/kg. Porównując tę wartość ze stężeniem Zn w 12 godzinie po wylęgu w terminie tym stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie tego pierwiastka w grupie IV i niższe w grupie I i II ($p \leq 0.05$). Statystycznie istotnie niższe stężenie Zn w woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wylęgu wykazano w grupie II w porównaniu do grupy I, III i IV ($p \leq 0.05$).

4.3.2. Analiza profilu peptydowego metodą MALDI–TOF MS

Porównanie intensywności widm masowych metodą MALDI–TOF MS wykazało różnice między grupami eksperymentalnymi i pozwoliło na identyfikację 12 peptydów lub podjednostek białkowych różnicujących badane grupy.

Profile peptydowe homogenatów wątroby oceniano wykorzystując widma mas w zakresie 600–10 000 Da. W profilu peptydowym wątroby zidentyfikowano następujące peptydy lub fragmenty białek: neuropeptyd podobny do FMRFamidu o masie cząsteczkowej 645 Da, transtyretynę (1117 Da), izoenzym II aminopeptydazy wrażliwej na puromycynę (2162 Da) oraz antygen MHC klasy I (7053 Da). Analiza różnic w grupach eksperymentalnych w 12 go-

dzinie po wylęgu i w 7 dniu życia kurcząt wykazała brak w tym terminie kilku sygnałów peptydowych. Masy cząsteczkowe nieobecne w widmach wątroby w 7 dniu życia kurcząt wynosiły 642 Da, a sygnały peptydowe mieściły się w zakresie 2160–2162 m/z. Istotne różnice w widmach masowych białek homogenatu wątroby stwierdzono między 12 godziną po wykluciu i 7 dniem życia kurcząt. Jon o masie 8460 Da we wszystkich próbkach pobranych w 12 godzinie po wylęgu był wyraźnie bardziej intensywny niż w próbkach pobranych w 7 dniu życia kurcząt. Jedynie stosunek sygnału o masie 7052 do 8460 Da różnicował próbki pobrane 12 godz. po wykluciu i w 7 dniu życia kurcząt. Analiza porównawcza profili peptydów w poszczególnych grupach w 12 godzinie po wylęgu wykazała obecność nowych peptydów w grupach III i IV.

W profilu peptydowym jelita cienkiego zidentyfikowano trzy peptydy lub białka: insulinę 2 o masie cząsteczkowej 5067 Da, podjednostkę 2 proteazy błony wewnętrznej mitochondrialnej (11 298 Da) oraz serglicynę (14 070 Da). Analiza profili próbek pobranych w 12 godzinie po wylęgu i w 7 dniu życia piskląt wykazała obecność peptydów o masie cząsteczkowej 11 300 i 13 875 Da we wszystkich badanych grupach z wyjątkiem grupy II w 7 dniu życia kurcząt.

W profilu peptydowym jelita grubego zidentyfikowano dwa białka: ligazę glutaminianowo-cysteinową o masie cząsteczkowej 8172 Da oraz podjednostkę protonowej ATPazy typu V o masie cząsteczkowej 9008 Da. Porównanie większych widm masowych wykazało różnice w odniesieniu do jonu o masie 8172 Da. Ten sygnał peptydowy w widmie masowym jelita grubego stwierdzono jedynie w 12 godzinie po wylęgu. Różnice w widmie mas wykazano również w grupie I, w której jon o masie około 9000 Da stwierdzono w próbkach jelita grubego w 12 godzinie po wylęgu, a dodatkowo w 7 dniu życia kurcząt wykazano sygnał o małej intensywności 11250 Da.

W woreczku żółtkowym zidentyfikowano cztery białka: serynowo-treoninową fosfatazę białkową o masie cząsteczkowej 8433 Da, podjednostkę protonowej ATPazy typu V (9002 Da), białko różnicowania naskórka (9152 Da) i hormon uwalniający prolaktynę (9678 Da).

4.3.3. Analiza mas cząsteczkowych białek metodą SDS-PAGE

Elektroforeza SDS-PAGE wykazała, że w badanych tkankach występowały liczne białka o masie w zakresie 15–250 kDa. Żele barwiono srebrem i błękitem brylantowym Coomassie, aby uwidocznić jak najwięcej białek. Białka o masie cząsteczkowej w zakresie od 25 do 150 kDa stanowiły największą część składu białek w obrębie tkanek. We wszystkich badanych tkankach wykazano obecność prążka o masie około 15 kDa odpowiadającego białku Cu/Zn SOD. Prążek ten nie występował w woreczku żółtkowym.

4.3.4. Analiza obecności i stężenia dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w wątrobie oraz jelicie cienkim i grubym

Wyniki analizy metodą western blot potwierdziły obecność Cu/Zn SOD w wątrobie oraz jelicie cienkim i grubym w 12 godzinie po wylęgu i w 7 dniu życia kurcząt we wszystkich grupach doświadczalnych i w grupie I ($p \leq 0.05$). Analiza żeli poliakrylamidowych z użyciem oprogramowania GelAnalyzer 19.1 wykazała najwyższą ekspresję Cu/Zn SOD w jelicie cienkim i grubym w 12 godzinie po wylęgu w grupach IV i III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt najwyższą ekspresję Cu/Zn SOD wykazano w jelicie cienkim w grupie IV i w jelicie grubym w grupie III ($p \leq 0.05$).

Praca IV

4.4. “Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens”

4.4.1. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w mięśni piersiowym

Statystycznie istotne różnice w profilu kwasów tłuszczowych wykazano w próbkach mięśnia piersiowego ptaków w dniu wylęgu (DOH) i w 7 dniu życia kurcząt, z wyjątkiem kwasów C 16:0, C 16:1 n-9, α C 18:3 n-3 i Σ n-3 PUFA w DOH i proporcji Σ PUFA n6/n3 w obu terminach pobierania próbek. W DOH zawartość C 4:0 była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości tego kwasu między grupą IV i pozostałymi grupami. Podobnie, w 7 dniu życia piskląt zawartość C 4:0 była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), natomiast w grupie IV była statystycznie istotnie niższa w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W DOH zawartość C 14:0 była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia piskląt zawartość C 14:0 była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.05$). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zawartości C 16:0 lub C 16:1 n9 w mięśni piersiowym w dniu wyklucia (DOH). W 7 dniu życia kurcząt zawartość C 16:0 była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$), natomiast nie różniła się istotnie od grupy III. Zawartość C 16:1 n9 w 7 dniu życia piskląt była statystycznie istotnie niższa w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami III i IV. W DOH stwierdzono statystycznie istotne różnice w zawartości kwasów oktadekanowych C18, z wyjątkiem α C 18:3 n-3. Stężenie kwasu C 18:0 w grupie I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), ale nie różniło się istotnie od stężenia w grupach III i IV. Zawartość kwasu oleinowego C 18:1 n-9 cis była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast zawartość kwasu C 18:2 n-6 była statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). Stężenie kwasu C 18:0 w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu z grupą I ($p \leq 0.05$). Stężenia C 18:1 n-9 cis i C 18:1 n-9 trans w grupie I

w 7 dniu życia kurcząt były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$), ale nie różniły się statystycznie od wykazanych w grupie IV. Zawartość C 18:2 n-6 była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w przypadku α C 18:3 n-3 była statystycznie istotnie niższa w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). Stężenie jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w grupie II w DOH było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), ale nie różniło się statystycznie od wartości dla grupy IV. Suma nasyconych kwasów tłuszczowych ($\sum$ SFA) w grupie II w DOH była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$), ale nie różniła się statystycznie od grupy III i IV. Suma nienasyconych kwasów tłuszczowych ($\sum$ UFA) była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$). $\sum$ PUFA w 7 dniu życia kurcząt była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast nie wykazano istotnych różnic w przypadku pozostałych badanych grup. Stosunek $\sum$ SFA/ $\sum$ UFA w grupie I był statystycznie istotnie niższy w porównaniu do grupy II w DOH ($p \leq 0.05$) i w porównaniu do grupy II i III w 7 dnia życia kurcząt ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt $\sum$ PUFA n-3 była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast $\sum$ PUFA n-6 była statystycznie istotnie wyższa w grupach I i III w porównaniu do grupy IV w DOH ($p \leq 0.05$) i statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy II w 7 dniu życia kurcząt ($p \leq 0.05$). Wskaźnik aterogenny (AI) w DOH był statystycznie istotnie niższy w grupach I i III w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$), a wskaźnik trombogenny (TI) w tym samym terminie badania był statystycznie istotnie niższy w grupie I w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W pozostałych grupach nie wykazano statystycznie istotnych różnic w wartościach AI lub TI w DOH. W 7 dniu życia kurcząt wartości AI i TI były statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Współczynniki h/H i $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA w DOH były statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu z grupą IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt współczynniki h/H i $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA w grupie II były statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą I i III ($p \leq 0.05$). W DOH współczynnik nasycenia (S/P) w grupie II był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu z grupą I i III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt współczynnik nasycenia (S/P) w grupie II i III był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$).

4.4.2. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w mięśniu udowym

Zawartość kwasu oktadekanowego (C 18:0) w grupie II była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy I w DOH ($p \leq 0.05$) i w porównaniu z grupami III i IV w 7 dniu życia

kurcząt ($p \leq 0.05$). Zawartość C 18:1 n-9 cis (kwas oleinowy) była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do grupy III w DOH ($p \leq 0.05$) i w grupie IV w porównaniu do grupy II w 7 dniu życia kurcząt ($p \leq 0.05$). Stężenia nienasyconych kwasów tłuszczowych ($\sum$ MUFA, $\sum$ PUFA i $\sum$ UFA) w DOH były statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I, II i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt suma MUFA w grupie I była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą II ($p \leq 0.05$), ale nie różniła się statystycznie od pozostałych grup. Suma wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w DOH w grupie I była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą III ($p \leq 0.05$), ale nie różniła się statystycznie od pozostałych grup, natomiast suma nasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) w grupie I była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w przypadku pozostałych grup eksperymentalnych. W DOH stosunek $\sum$ SFA/ $\sum$ UFA był statystycznie istotnie niższy w grupach II i III w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Jednakże, w 7 dniu życia kurcząt stosunek ten był statystycznie istotnie niższy w grupie I w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W DOH $\sum$ PUFA n-3 była statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Ponadto, $\sum$ PUFA n-6 w DOH była statystycznie istotnie niższa w grupie I w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt sumy n-3 PUFA i n-6 PUFA w grupie III były statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą I ($p \leq 0.05$), ale nie różniły się statystycznie od innych grup eksperymentalnych. W DOH stosunek $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA był statystycznie istotnie wyższy w grupie III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), podczas gdy w 7 dniu życia kurcząt wartości te były statystycznie istotnie wyższe w grupach I i IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). W DOH wartość indeksu nasycenia (S/P) była statystycznie istotnie wyższa w grupie I w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). Wartości S/P w 7 dnia życia kurcząt były statystycznie istotnie wyższe w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Współczynnik $\sum$ PUFA n6/n3 w grupie II w DOH był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$), ale nie różnił się statystycznie od innych grup eksperymentalnych. Wartości AI i TI w DOH były statystycznie istotnie wyższe w grupach I i II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wartości AI i TI były statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). W DOH wskaźnik hipocholesterolemiczny/hipercholesterolemicznego (h/H) był statystycznie istotnie wyższy w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt wskaźnik ten był statystycznie istotnie niższy w grupie III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$).

4.4.3. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w wątrobie

Zawartość kwasu butanowego (C 4:0) w DOH była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie C 4:0 było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu tego kwasu między grupą III i pozostałymi grupami eksperymentalnymi. W DOH stężenie kwasu heksadekanowego (C 16:0) było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). Podobnie, w 7 dniu życia kurcząt stężenie kwasu heksadekanowego było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy I i IV. W DOH nie wykazano statystycznie istotnych różnic w stężeniu C 16:1 n9 między grupą I i grupami eksperymentalnymi. Stężenie C 16:1 n9 w wątrobie w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu z grupą III ($p \leq 0.05$), podczas gdy stężenie w 7 dnia życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu z grupą I i IV ($p \leq 0.05$). W porównaniu z grupą I stężenie kwasu oleinowego (C 18:1 n-9 cis) w DOH było statystycznie istotnie niższe w grupie III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu z grupą II ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie kwasu elaidynowego (C 18:1 n-9 trans) w grupach III i IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W 7 dnia życia kurcząt zawartość kwasu elaidynowego była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Stężenie kwasu linolowego (C 18:2 n-6) w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie kwasu linolowego (C 18:2 n-6) w grupach III i IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W DOH suma nasyconych kwasów tłuszczowych ($\sum$ SFA) w wątrobie w grupach III i IV była statystycznie istotnie niższa w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W DOH sumy kwasów tłuszczowych jednonienasyconych, wielonienasyconych i nienasyconych ($\sum$ MUFA, $\sum$ PUFA i $\sum$ UFA) były statystycznie istotnie wyższe w grupach I i IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), w grupie III w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.05$), oraz w grupach I i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie MUFA było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Ponadto, $\sum$ PUFA i $\sum$ UFA była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W DOH i w 7 dniu życia kurcząt stosunek kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych ($\sum$ SFA/ $\sum$ UFA) był statystycznie istotnie niższy w grupie III w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$).

W obu terminach pobierania próbek suma wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-6 była statystycznie istotnie niższa w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W DOH indeks aterogeny (AI) i indeks trombogenny (TI) był statystycznie istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wartości AI i TI w grupie II były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z grupami I, III i IV ($p \leq 0.05$). W DOH stosunek kwasów hipocholesterolemicznych/hipercholesterolemicznych (h/H) i $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA były statystycznie istotnie niższe w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt, stosunek h/H w grupie I był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$). Podobnie, stosunek $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA w grupie I w 7 dniu życia kurcząt był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), ale nie różnił się statystycznie od innych grup eksperymentalnych. Wskaźnik nasycenia (S/P) w DOH był statystycznie istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wskaźnik ten był statystycznie istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). $\sum$ PUFA n6/n3 w DOH była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt była ona statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$).

4.4.4. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w tkankach jelita cienkiego

W DOH stężenie C 4:0 było statystycznie istotnie wyższe w tkance jelita cienkiego w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic w zawartości C 4:0 w pozostałych grupach. W 7 dniu życia kurcząt zawartość C 4:0 była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W DOH zawartość kwasu heksadekanowego (C 16:0) była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt zawartość tego kwasu w grupach I i II była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Zawartość C 16:1 n9 w tkance jelita cienkiego w DOH była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast zawartość w 7 dnia życia kurcząt była statystycznie istotnie niższa w grupach II i III w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). W DOH zawartość kwasu cis C 18:1 n-9 była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt zawartość tego kwasu była statystycznie istotnie wyższa w grupie I i IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). Analiza zawartości C 18:1 n-9 trans w DOH wykazała, że była ona statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu z grupą I ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt zawartość C 18:1 n-9 trans była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu z grupą III ($p \leq 0.05$). W DOH

zawartość kwasu linolowego (C 18:2 n-6) była statystycznie istotnie wyższa w grupie I i II w porównaniu z grupą IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt zawartość tego kwasu była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu z pozostałymi grupami eksperymentalnymi ($p \leq 0.05$). Suma nasyconych kwasów tłuszczowych (Σ SFA) w DOH była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu z grupą II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia piskląt suma tych kwasów w grupie II była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W DOH suma jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (Σ MUFA) była statystycznie istotnie wyższa w grupach III i IV w porównaniu z grupą I ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt była statystycznie istotnie wyższa w grupie I i IV w porównaniu z grupą II ($p \leq 0.05$). W DOH Σ PUFA była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). W DOH suma nienasyconych kwasów tłuszczowych (Σ UFA) była statystycznie istotnie wyższa w grupie II w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt Σ UFA w grupie III była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W DOH stosunek Σ SFA/ Σ UFA w grupie IV był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt był statystycznie istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Zawartość Σ PUFA n-6 i stosunek Σ PUFA/ Σ SFA w DOH były statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt zawartość Σ PUFA n-6 była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu z pozostałymi grupami eksperymentalnymi ($p \leq 0.05$). W DOH, indeks nasycenia (S/P) był statystycznie istotnie wyższy w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt był on statystycznie istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W DOH, stosunek Σ PUFA n6/n3 był statystycznie istotnie wyższy w grupie II w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt był statystycznie istotnie wyższy w grupie III w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). Wskaźnik aterogenny (AI) w DOH był statystycznie istotnie niższy w grupie II w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$), a wskaźnik trombogenny (TI) w grupie IV był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wartości AI i TI były statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Wskaźnik h/H w DOH był statystycznie istotnie niższy w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt był statystycznie istotnie niższy w grupie II w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$).

4.4.5. Analiza wybranych parametrów biochemicznych w surowicy kurcząt

Analiza parametrów biochemicznych nie wykazała statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniach aminotransferazy alaninowej (ALAT) i bilirubiny bezpośredniej (BIL D) w dniu wylęgu (DOH) oraz w stężeniach gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT), białka całkowitego (TP) i amylazy (AMY) w 7 dniu życia kurcząt. W 7 dniu życia kurcząt stężenie ALAT było statystycznie istotnie niższe w grupach II i III w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Stężenie BIL D w surowicy było statystycznie istotnie niższe w grupach II, III i IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.0001$), natomiast w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.0001$). Stężenie TP w DOH w grupie II było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.0001$), a stężenie AMY w grupie IV w DOH statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.0001$). Stężenie BIL T w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt wartość badanego parametru w surowicy w grupie III była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.0001$). Analiza stężenia CHOL w DOH wykazała statystycznie istotnie wyższe wartości w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II, a w 7 dniu życia kurcząt stężenie CHOL w grupie III było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.0001$). Stężenie HDL D w surowicy w grupie III w DOH było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.0001$). Podobnie, w 7 dniu życia kurcząt, stężenie HDL D było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.0001$). W DOH, stężenie LDL D i lipazy w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupach eksperymentalnych w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.0001$). Jednakże, w 7 dniu życia kurcząt, stężenie LDL D we wszystkich grupach eksperymentalnych było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.0001$), natomiast w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.0001$). Stężenie lipazy w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), podczas gdy w pozostałych grupach nie różniło się statystycznie od wartości dla grupy I. Stężenie TG w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.0001$). Stężenie kwasów żółciowych w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.0001$).

W DOH stężenie LDH było statystycznie istotnie wyższe w grupie I i III w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.0001$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.0001$).

4.4.6. Analiza stężenia MDA, albuminy oraz stosunku MDA/albumina w woreczku żółtkowym w 18 DOI (24 godz. po suplementacji *in ovo*)

W 24 godzinie po suplementacji *in ovo* stężenie MDA w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie niższe w grupach II i IV w porównaniu do grupy I ($p > 0.05$). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniu albuminy w woreczku żółtkowym.

4.4.7. Analiza stężenia MDA, albuminy oraz stosunku MDA/albumina w surowicy i tkankach kurcząt

W DOH stężenie MDA w surowicy kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie MDA w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W DOH nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniu MDA w mięśniu piersiowym. Podobnie, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniu MDA w jelicie cienkim w żadnym z terminów pobierania próbek. W 7 dniu życia kurcząt nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniu MDA w mięśniu udowym i w wątrobie. W DOH stężenie MDA w mięśniu udowym było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Stężenie MDA w mięśniu piersiowym w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie MDA w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$), podczas gdy w pozostałych grupach eksperymentalnych nie wykazano statystycznie istotnych różnic w wartościach badanego parametru. W DOH nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniu albuminy w jelicie cienkim, mięśniu udowym, wątrobie i w woreczku żółtkowym. Stężenie albuminy w surowicy w DOH było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$) oraz w grupach I i III w porównaniu z grupą II ($p \leq 0.05$). Stężenie albuminy w mięśniu piersiowym w DOH było statystycznie istotnie niższe w grupach II i III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt w żadnej z badanych tkanek nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami w stężeniu albuminy. W żadnym z terminów badania nie stwierdzono także statystycznie istotnych różnic między grupami w proporcji MDA/albuminy w jelicie cienkim. W DOH stosunek

MDA/albumin w mięśniu udowym był statystycznie istotnie wyższy w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stosunek ten w mięśniu udowym był statystycznie istotnie wyższy w grupie IV w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W DOH stosunek MDA/albumin w surowicy był statystycznie istotnie wyższy w grupie I w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższy w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). Stosunek MDA/albumin w mięśniu piersiowym w DOH był statystycznie istotnie wyższy w grupach II i III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt był statystycznie istotnie wyższy w grupie I w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$). Stosunek MDA/albumina w woreczku żółtkowym był w DOH statystycznie istotnie wyższy w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$).

Praca V

4.5. “Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks”

4.5.1. Analiza parametrów produkcyjnych

W okresie od 0 do 10 dnia życia BWG był statystycznie istotnie wyższy w grupie III w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W dniach od 10 do 24 i od 24 do 42 dnia życia BWG był statystycznie istotnie niższy w grupie II w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). Podobnie, w całym okresie doświadczenia BWG w grupie II był statystycznie istotnie niższy w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych (0–42) ($p \leq 0.05$). W badanym okresie (0–42) FI był statystycznie istotnie niższy w grupie II w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). W okresie od 0 do 10 dnia życia FI był statystycznie istotnie niższy w grupie II w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). W okresie od 0 do 10 dnia życia FCR w grupie III był statystycznie istotnie niższy w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). W okresie od 10 do 24 dnia życia stwierdzono statystycznie istotnie wyższe wartości FCR w grupie II w porównaniu z grupą I i III ($p \leq 0.05$). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami w odniesieniu do początkowej masy ciała kurcząt. W porównaniu z grupą I w grupie II wykazano istotnie wyższy wskaźnik śmiertelności kurcząt (3,33%) ($p = 0.362$).

4.5.2. Analiza stężenia białek ostrej fazy w surowicy i tkankach kurcząt

W DOH stężenie α -1-AGP w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie α -1-AGP w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia α -1-AGP w wątrobie w DOH wykazała statystycznie istotnie wyższe wartości w grupach I i III w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie α -1-AGP w wątrobie było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim stężenie α -1-AGP w DOH było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Podobnie, w 7 dniu życia kurcząt stężenie α -1-AGP było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie α -1-AGP w jelicie grubym

było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tego białka w jelicie grubym było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Stężenie α -1-AGP w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie wyższe w grupach III i IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$).

Stężenie Hp w wątrobie w DOH było w grupie III statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie Hp w wątrobie było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim w DOH stężenie Hp było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt stężenie tego białka w jelicie cienkim było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$). Stężenie HP w jelicie grubym w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie Hp w jelicie grubym w grupie III było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$).

Stężenie ceruloplazminy w surowicy w DOH było statystycznie istotnie niższe w grupach III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie ceruloplazminy w surowicy było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). Stężenie ceruloplazminy w wątrobie w DOH było statystycznie istotnie niższe w grupie II w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt jej stężenie w wątrobie było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W DOH stwierdzono statystycznie istotnie niższe stężenie ceruloplazminy w jelicie cienkim kurcząt z grupy II i III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia ceruloplazminy w DOH w jelicie grubym wykazała, że było ono statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt stężenie tego białka było statystycznie istotnie niższe w grupach I i IV w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Stężenie ceruloplazminy w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie SAA w surowicy kurcząt było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie SAA w surowicy było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W wątrobie w 7 dniu życia kurcząt stężenie SAA było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia SAA w DOH w jelicie cienkim wykazała, że było ono statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w

7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie SAA w jelicie grubym było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Stężenie SAA w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie MBL w surowicy kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie MBL w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Stężenie MBL w wątrobie w DOH w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt stężenie tego białka w wątrobie było statystycznie istotnie niższe w grupie III w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie MBL w jelicie cienkim w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym w DOH stężenie MBL w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie to było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Stężenie MBL w woreczku żółtkowym w grupie I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$).

4.5.3. Analiza stężenia immunoglobulin w surowicy i tkankach kurcząt

W DOH stężenie IgA w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IgA w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Stężenie IgA w wątrobie w DOH w grupie II i IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt stężenie IgA w wątrobie w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH wykazano statystycznie istotnie niższe stężenie IgA w jelicie cienkim kurcząt z grupy II w porównaniu do pozostałych grup ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej immunoglobuliny w jelicie cienkim było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym w DOH stężenie IgA u kurcząt z grupy II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie IgA w jelicie grubym we wszystkich grupach eksperymentalnych było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). Statystycznie istotnie wyższe stężenie IgA stwierdzono w woreczku żółtkowym ptaków z grup II i III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie IgY w surowicy w grupie III było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IgY w surowicy było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie IgY w wątrobie w grupie III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej immunoglobuliny w wątrobie w grupie I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IgY w jelicie cienkim w grupie III i IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IgY w jelicie cienkim w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IgY w jelicie grubym w grupie III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Analogiczne wyniki uzyskano w badaniu wykonywanym w 7 dniu życia kurcząt ($p \leq 0.05$). Wykazano także statystycznie istotnie niższe stężenie IgY w woreczku żółtkowym ptaków z grupy II w porównaniu z grupą I i III ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie IgM w surowicy w grupie I i IV było statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą II i III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IgM w surowicy w grupie III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W wątrobie w 7 dniu życia kurcząt stężenie IgM w grupie II było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Zmiany wykazano także w DOH w jelicie cienkim, w którym stężenie IgM w grupie I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie IgM w jelicie cienkim we wszystkich grupach eksperymentalnych było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym w DOH stężenie IgM w grupie III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej immunoglobuliny w jelicie grubym w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I, III i IV ($p \leq 0.05$). Stwierdzono także statystycznie istotnie niższe stężenie IgM w woreczku żółtkowym ptaków z grupy IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$).

4.5.4. Analiza ekspresji mRNA IgA, IgM i IgY w jelicie biodrowym

Ekspresja mRNA IgA, IgM i IgY w jelicie biodrowym była statystycznie istotnie wyższa w 7 dniu życia kurcząt w porównaniu do DOH ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt ekspresja mRNA IgA była statystycznie istotnie wyższa w grupie III w porównaniu do pozostałych grup

eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). Ekspresja mRNA IgM była statystycznie istotnie wyższa w grupie IV w porównaniu do grupy I ($p \leq 0.05$).

4.5.5. Analiza stężenia cytokin w surowicy i tkankach kurcząt

W DOH stężenie IL 1- β w surowicy kurcząt z grupy II było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL 1- β w surowicy kurcząt z grupy I było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$). W DOH i w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL 1- β w wątrobie w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy IV ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IL 1- β w jelicie cienkim było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w jelicie cienkim w grupie IV było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym w DOH stężenie IL 1- β było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-1- β w jelicie grubym było statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-1- β w woreczku żółtkowym w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie IL-2 w surowicy kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-2 w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-2 w wątrobie kurcząt w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie I w porównaniu do grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia IL-2 w DOH w jelicie cienkim kurcząt z grupy III i IV wykazała, że było ono statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w jelicie cienkim w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IL-2 w jelicie grubym kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-2 w jelicie grubym w grupie III i IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-2 w woreczku żółtkowym kurcząt z grupy III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I, II i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie IL-6 w surowicy kurcząt z grupy I i IV w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia IL-6 w DOH w wątrobie kurcząt z grupy II wykazała, że było ono statystycznie istotnie

wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w wątrobie w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-6 w jelicie cienkim kurcząt z grupy III w DOH było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie w jelicie cienkim w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IL-6 w jelicie grubym kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w jelicie grubym w grupie III było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-6 w woreczku żółtkowym kurcząt z grupy I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie IL-8 w surowicy kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-8 w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-8 w wątrobie kurcząt w DOH w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w wątrobie było statystycznie istotnie wyższe w grupie III w porównaniu do grupy I i pozostałych grup doświadczalnych. W DOH stężenie IL-8 w jelicie cienkim kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-8 w jelicie cienkim w grupie II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt wykazano także statystycznie istotnie niższe stężenie IL-8 w jelicie grubym w grupie I w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-8 w woreczku żółtkowym było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie IL-10 w surowicy kurcząt z grupy III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$). W wątrobie w DOH stężenie IL-10 u kurcząt z grupy III i IV było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w wątrobie w grupie III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). W jelicie cienkim kurcząt z grupy III stężenie IL-10 w DOH było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-10 w jelicie cienkim w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$). W jelicie grubym kurcząt z grupy IV wykazano staty-

stycznie istotnie wyższe stężenie IL-10 w DOH w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe stężenie IL-10 stwierdzono w grupie III w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie IL-12 w surowicy kurcząt z grupy I było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-12 w wątrobie kurcząt z grupy I i III w DOH było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i IV ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IL-12 w jelicie cienkim kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie IL-12 w jelicie cienkim było statystycznie istotnie wyższe w grupie III i IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie IL-12 w jelicie grubym kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w jelicie grubym w grupie III i IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Stężenie IL-12 w woreczku żółtkowym kurcząt z grupy II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie TNF- α w surowicy kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie TNF- α w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Stężenie TNF- α w wątrobie kurcząt z grupy I w DOH było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie TNF- α w jelicie cienkim kurcząt z grupy I było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). W 7 dniu życia kurcząt stężenie TNF- α w jelicie grubym w grupie III było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$). Stężenie TNF- α w woreczku żółtkowym kurcząt z grupy III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$).

W DOH stężenie INF- γ w surowicy kurcząt z grupy IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy III ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w surowicy w grupie II było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy III i IV ($p \leq 0.05$). Stężenie INF- γ w wątrobie kurcząt w DOH było statystycznie istotnie wyższe w grupie II w porównaniu do grupy I, III i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie

tej cytokiny w grupie III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie INF- γ w jelicie cienkim w grupie III było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy I i IV ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie niższe w grupie IV w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). Analiza stężenia INF- γ w jelicie grubym w DOH wykazała, że u kurcząt z grupy IV było ono statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt było statystycznie istotnie wyższe w grupie IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$). Stężenie INF- γ w woreczku żółtkowym kurcząt z grupy I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grupy II, III i IV ($p \leq 0.05$).

W 7 dniu życia kurcząt stężenie TGF- β 1 w surowicy w grupie IV było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i II ($p \leq 0.05$). W wątrobie kurcząt z grupy II i IV w DOH wykazano statystycznie istotnie niższe stężenie TGF- β 1 w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$), a w 7 dniu życia kurcząt statystycznie istotnie wyższe stężenie tej cytokiny w grupie II w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi ($p \leq 0.05$). W DOH stężenie TGF- β 1 w jelicie cienkim kurcząt z grupy I było statystycznie istotnie niższe w porównaniu do grup eksperymentalnych ($p \leq 0.05$). Wykazano także statystycznie istotnie wyższe stężenie TGF- β 1 w DOH w jelicie grubym kurcząt z grupy IV w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p \leq 0.05$), natomiast w 7 dniu życia kurcząt stężenie tej cytokiny w jelicie grubym było statystycznie istotnie niższe w grupie I w porównaniu do grupy II i III ($p \leq 0.05$). Stężenie TGF- β 1 w woreczku żółtkowym kurcząt z grupy II było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy I i III ($p \leq 0.05$).

4.5.6. Analiza względnej masy narządów limfatycznych u kurcząt

W 7 dniu życia kurcząt względna masa śledziony w grupie I była statystycznie istotnie niższa w porównaniu do grupy II ($p \leq 0.05$), ale nie różniła się statystycznie od pozostałych grup eksperymentalnych.

5. DYSKUSJA

Szczegółowe omówienie wyników badań zawarte jest w publikacjach składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

Praca I

5.1. „Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens.”

W komercyjnym systemie produkcji brojlerów okres od 18 dnia inkubacji do 4-7 dnia po wylęgu jest krytyczny z punktu widzenia przeżycia i dalszego rozwoju piskląt (Ferket, 2006). Z dotychczas opublikowanych badań wynika, że stosowanie w tym okresie drogą *in ovo* probiotyków i mikroelementów stymuluje rozwój poszczególnych narządów i układów, w tym zwłaszcza układu odpornościowego, co pozwala ograniczyć występowanie chorób i obniżyć współczynnik padnięć piskląt (Cox i Dalloul, 2015). Celem badań opisanych w pracy „Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens” było określenie wpływu skojarzonego podawania *in ovo* chelatu Zn-Gly i probiotyku wieloszczepowego na wybrane wskaźniki komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej kurcząt poprzez ocenę immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) i śledziony (SMLCs). W badaniach oceniono odsetek komórek z ekspresją cząsteczek CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8α⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD25⁺, MHC klasy II⁺, Bu-1A⁺, CD79A⁺, TCRγδ⁺ i KUL01⁺ (monocyty/makrofagi), a dodatkowo także wskaźnik wylęgowości piskląt i parametry produkcyjne ptaków w okresie 0 - 7 dzień życia.

5.1.1. Ocena wskaźnika wylęgowości

W badaniach wykazano, że łączne podanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly powodowało istotne zmniejszenie współczynnika wykluwalności piskląt. Podobnie, podanie *in ovo* pojedynczych suplementów, tj. probiotyku wieloszczepowego lub chelatu Zn-Gly także skutkowało zmniejszeniem wykluwalności piskląt, ale nie wykazano statystycznie istotnych różnic w wartościach badanego parametru pomiędzy grupami. Uzyskane wyniki badań są zgodne z opublikowanymi wcześniej przez Meijerhof i Hulet, (1997); Hashemzadeh i

in. (2010); Hosseini-Mansoub i in. (2011); Yamawaki i in. (2013), którzy wykazali, że aplikacja *in ovo* bakterii probiotycznych prowadzi do zmniejszenia wykluwalności, a przyczyną takiego działania może być m.in. rodzaj suplementowanych bakterii probiotycznych i ich dawka. Podobna zależność dotyczy cynku, który w powszechnej opinii uważany jest za pierwiastek nietoksyczny dla ludzi i zwierząt (Roohani i in., 2013). Wprawdzie w badaniach stwierdziliśmy mniejszą wylęgowość piskląt po podaniu *in ovo* chelatu Zn-Gly oraz tego preparatu w połączeniu z probiotykiem wieloszczepowym, jednak wcześniej opublikowane wyniki badań nie wykazywały niekorzystnego wpływu podawania Zn *in ovo* na rozwijający się zarodek kury (Tako i in., 2005; Goel i in., 2012; Oliveira i in., 2015). Należy zatem przypuszczać, że efekt oddziaływania cynku na zarodek jest uzależniony od dawki pierwiastka, a także jego postaci chemicznej i biodostępności. Podanie cynku w postaci organicznej, cechującej się większą biodostępnością może oddziaływać toksycznie, powodując uszkodzenie zarodków (Star i in., 2012; Swain i in., 2016). Takie spostrzeżenia poczynili w swoich badaniach m.in. Yair i in. (2013), którzy po podaniu *in ovo* 0,6 mg Zn/jajo w postaci biopleksu Zn wraz z innymi minerałami i witaminami wykazali obniżenie wylęgowości do poziomu 86%. Tako i wsp. (2005) zaobserwowali natomiast, że podanie *in ovo* 0,5 mg chelatów Zn w 17 dniu inkubacji zarodka może skutkować zwiększoną aktywnością biochemiczną enzymów i transporterów rąbka szczoteczkowego oraz zwiększeniem powierzchni kosmków jelitowych, co wpływa na rozwój jelit. Można zatem założyć, że niższe wskaźniki wylęgowości stwierdzone w naszym badaniu zostaną zrekomensowane korzystnym wpływem związków Zn na pisklęta w okresie po wyklućciu. Zastosowana w badaniach organiczna forma Zn w postaci chelatu glicynowego cechuje się lepszą wchłanianością i przyswajalnością w porównaniu do postaci nieorganicznych, co mogło skutkować zwiększeniem koncentracji pierwiastka w woreczku żółtkowym i zmniejszeniem wylęgowości piskląt. Podanie w trakcie rozwoju embrionalnego łatwo przyswajalnego Zn w postaci chelatu glicynowego może także prowadzić do zaburzenia równowagi mineralnej (Oliveira i in. 2015) oraz nadmiernej kumulacji Zn i szkodliwego oddziaływania na zarodek. Warto nadmienić, że bakterie probiotyczne włączają do swojej biomasy mikroelementy (Hussain i in., 2022), takie jak Zn, ułatwiając jego wchłanianie, co może prowadzić do zwiększenia koncentracji pierwiastka w tkankach i narządach oraz oddziaływania toksycznego, które także mogło wpłynąć na obniżenie wylęgowości w grupach doświadczalnych.

5.1.2. Ocena parametrów produkcyjnych

Szczepy bakterii probiotycznych oraz Zn wpływają na rozwój i prawidłowe funkcjonowanie jelit, co wiąże się z usprawnieniem procesów trawienia i wchłaniania oraz rzutuje na

uzyskiwane efekty produkcyjne (Shah i in., 2019). W naszym doświadczeniu najwyższą masę ciała, ocenianą w pierwszych 7 dniach życia, uzyskiwały ptaki otrzymujące *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly, natomiast wskaźnik ten nie różnił się statystycznie od tego parametru ocenianego w pozostałych grupach. Dane te wskazują, że podawanie probiotyków w późnym stadium embrionalnym może nie być efektywne w odniesieniu do oddziaływania na przewód pokarmowy ptaków i procesy trawienne. Interesującym jest fakt, że wykorzystywane w badaniach suplementy przyczyniały się do istotnego obniżenia współczynnika wykorzystania paszy w porównaniu do grupy kontrolnej, przy czym najniższą wartość FCR odnotowano w grupie otrzymującej *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Warto zaznaczyć, że podawanie probiotyków *in ovo* prowadzi do wczesnego zasiedlania przewodu pokarmowego pożytecznymi mikroorganizmami i zmiany mikrobiomu jelit (Shehata i in., 2021). Procesy te wpływają na fizjologiczny rozwój przewodu pokarmowego pisklęcia w pierwszych 21 dniach życia, w tym m.in. na długość jelit i pH przewodu pokarmowego (Shehata i in., 2021). Należy przypuszczać, że połączenie probiotyków i Zn zwiększa biodostępność tego pierwiastka, który oddziałując synergistycznie z probiotykiem wpływa korzystnie na wysokość kosmków i całkowitą liczbę komórek kubkowych jelita (Shah i in., 2019). Łączne podawanie Zn i probiotyków przyczynia się zatem do zwiększenia wchłaniania tego pierwiastka, który poprzez wpływ na metabolizm białek, cukrów i tłuszczów (Liu i in., 2015) prowadzi do poprawy parametrów produkcyjnych.

5.1.3. Ocena immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) i śledziony (SMLCs) kurcząt

Optymalne funkcjonowanie organizmu drobiu w okresie po wylęgu, w którym ptaki narażone są na działanie licznych czynników endo- i egzogennych, wymaga współdziałania specyficznych immunokompetentnych komórek układu odpornościowego, w tym limfocytów T i B, komórek NK (natural killer), APC (antygen presenting cells) i innych (Kaiser, 2010; Sławińska i in., 2014). Wczesna ingerencja w mechanizmy układu odpornościowego, dokonywana poprzez podawanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly, przyczynia się do modulowania procesów odporności wrodzonej, dzięki której nowo narodzone kurczęta zdolne są już do reagowania na antygeny, zmniejszając tym samym ryzyko zakażenia po wykluciu (Sławińska i in., 2014, Alizadeh i in., 2020).

Przeprowadzone badania wykazały, że najwyższy odsetek limfocytów pomocniczych T CD4⁺ w krwi obwodowej stwierdzono bezpośrednio po wykluciu i w 7 dniu badania w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Dane te potwierdzają

wpływ skojarzonego podawania tych związków na procesy różnicowania i proliferacji limfocytów oraz dowodzą stymulacji komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej u ptaków. Komórki T CD4⁺ zaangażowane są w różnych procesach odpowiedzi immunologicznej i uczestniczą m.in. w aktywacji limfocytów B, makrofagów i limfocytów T cytotoksycznych o fenotypie CD8⁺ (Luckheeram i in., 2012). Potwierdzeniem tej tezy jest wykazany w badaniach wysoki odsetek tych komórek w krwi obwodowej w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly w korelacji z wysoką ekspresją receptora KUL01⁺ na monocytach/makrofagach. Limfocyty T CD4⁺ biorą także udział w procesach prezentacji antygeny poprzez interakcję z cząsteczkami głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy II (Vignali, 1994). Wykazany w badaniach wysoki odsetek tej subpopulacji komórek w korelacji z wysoką ekspresją cząsteczki MHC II⁺ w tej grupie ptaków w analogicznych terminach badania dowodzi wzmocnienia procesów prezentacji antygeny. Uzyskane wyniki sugerują, że podawany *in ovo* probiotyk wieloszczepowy, zawierający liczne antygeny bakteryjne, uruchamia reakcję immunologiczną organizmu w odpowiedzi na stymulację tymi antygenami, natomiast limfocyty T stanowią populację komórek funkcjonalnie zaangażowanych we wczesną odpowiedź immunologiczną na antygeny. Komórki te pojawiają się w krwi obwodowej najprawdopodobniej w wyniku selektywnego zasiedlania nabłonka jelitowego przez bakterie probiotyczne i aktywacji limfocytów śródnabłonkowych (ILE), które odgrywają istotną rolę w ochronnej odpowiedzi immunologicznej na patogeny jelitowe (Wickramasuriya i in., 2022). Odmienne kształtowały się wyniki analizy jednojądrzastych komórek śledziony, w której wykazano, że w 12 godzinie po wykluciu nie ma istotnych różnic w odsetku komórek z ekspresją CD4⁺ w grupach ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy. Ponadto, w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* chelat Zn-Gly ekspresja ta była niższa w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych i kontrolnej. Także w 7 dniu życia odsetek limfocytów T CD4⁺ był niższy w grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Niski odsetek komórek z ekspresją cząsteczki CD4⁺ w śledzionie w grupach doświadczalnych wskazuje, że w organizmie drobiu nie toczą się procesy zapalne, będące reakcją na antygeny podawane *in ovo*. Wysoki odsetek tych komórek stwierdzony w grupie kontrolnej wskazuje natomiast na procesy zasiedlania organizmu antygenami środowiskowymi pobudzającymi ogólną odpowiedź immunologiczną, przejawiającą się indukcją i proliferacją limfocytów w narządach limfatycznych. Dodatkowym potwierdzeniem procesu różnicowania limfocytów T oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej jest wykazany w obu terminach badań wysoki odsetek limfocytów B z ekspresją cząsteczki Bu-1A⁺ w krwi obwodowej i w śledzionie w grupie ptaków otrzymujących *in*

ovo probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Taka kostymulacja limfocytów B poprzez prezentację antygeny przez limfocyty T usprawnia proces syntezy immunoglobulin oraz odpowiedź humoralną organizmu (Vazquez i in., 2015).

Rozbieżne wyniki uzyskano w badaniach w odniesieniu do limfocytów z ekspresją cząsteczki CD8⁺. Wykazano, że odsetek tych komórek w krwi obwodowej bezpośrednio po wykluciu był, w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly, niższy w porównaniu do grupy kontrolnej, po czym wzrastał osiągając najwyższe wartości w 7 dniu badania. Odmienne kształtowała się ekspresja CD8⁺ w śledzionie, w której najwyższy odsetek komórek z ekspresją badanej cząsteczki stwierdzono w tej grupie ptaków w 12 godzinie po wykluciu, natomiast w 7 dniu po wykluciu był on najniższy. Wzrost odsetka tych komórek po wykluciu przy braku objawów chorobowych u ptaków z badanej grupy wskazuje na procesy immunomodulacji limfocytów T przez związki stosowane *in ovo*. Probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly, pełniące funkcję antygenów, pobudzają limfocyty cytotoksyczne CD8⁺ prawdopodobnie poprzez nasilenie proliferacji i funkcji limfocytów T. Analiza uzyskanych wyników badań pozwala przypuszczać, że jednym z efektów działania wieloszczepowego probiotyku i chelatu Zn-Gly u drobiu jest indukcja sygnałów prozapalnych aktywujących cytotoxyczność komórek biorących udział w ochronie przed zakażeniem przy jednoczesnym modulowaniu odpowiedzi immunologicznej i jej polaryzacji w kierunku Th1 i Th2. Takie oddziaływanie zmierza do utrzymywania równowagi pro- i przeciwzapalnej w odpowiedzi na działanie licznych antygenów, jakimi są probiotyczne szczepy drobnoustrojów i cynk. Zwiększenie po wykluciu aktywności limfocytów Th1, głównie z ekspresją CD8⁺, świadczy o promowaniu komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej i nie wyklucza rozwijającego się procesu zapalnego w odpowiedzi na zastosowany *in ovo* antygen i czynniki środowiskowe.

Analizowana w doświadczeniu subpopulacja limfocytów wykazujących ekspresję receptora CD4⁺CD25⁺ stanowi grupę komórek o właściwościach immunosupresyjnych, które funkcjonalnie podobne są do komórek Treg (limfocyty T regulatorowe) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ssaków (Selvaraj, 2013; Calefi i in., 2016). U kur pełnią one rolę komórek Treg, wygaszając nadmierne reakcje immunologiczne oraz hamując nadmierny rozwój limfocytów T (Shanmugasundaram i Selvaraj, 2011). Stwierdzony w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu badania wysoki odsetek tych komórek w krwi obwodowej w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly świadczy, że część z tych komórek pełni rolę immunosupresyjną jako komórki regulatorowe. Prawdopodobnie komórki te hamują reakcję zapalną spowodowaną nadmierną podażą wieloszczepowego probiotyku oddziałującego na organizm zarodka jako antygeny. Stwierdzony jednocześnie wysoki odsetek limfocytów TCD4⁺ i TCD8⁺ w tej

grupie potwierdza dodatkowo immunoregulacyjną rolę tych komórek w reakcji na antygen, jakim są szczepy bakterii i chelat Zn-Gly. Analogicznie, wysoki odsetek komórek z ekspresją CD4⁺CD25⁺ w śledzionie w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu życia, zwłaszcza w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly, jest efektem migracji tych komórek z puli obwodowej i świadczy o uruchomieniu mechanizmów immunoregulacji w odpowiedzi na antygeny wprowadzane *in ovo*. Należy podkreślić, że sama charakterystyka immunofenotypowa komórek CD4⁺CD25⁺ nie daje podstaw do stwierdzenia, że komórki te należą do populacji limfocytów immunosupresyjnych. Biorąc pod uwagę fakt, że w śledzionie w 12 godzinie po wykluciu oraz w krwi obwodowej w 7 dniu życia stwierdzono wzrost ekspresji cząsteczki TCR i CD25⁺ na limfocytach należy przyjąć, że w tym okresie dominują komórki T pamięci pojawiające się w wyniku suplementacji *in ovo*, których zadaniem jest tłumienie odpowiedzi immunologicznej. W 7 dniu życia w śledzionie kurcząt stwierdzono natomiast niski odsetek komórek z ekspresją CD25⁺ i TCR, co przemawia za funkcjonowaniem limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ utrzymujących homeostazę pomiędzy odpowiedzią pro- i przeciwzapalną.

W doświadczeniu oceniano także populację komórek z ekspresją cząsteczki CD25⁺ i MHC II. Wykazany w okresie po wykluciu wyższy odsetek limfocytów T CD25⁺ w krwi obwodowej w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly dowodzi aktywowania swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez pobudzenie limfocytów Th1. Wysoki odsetek tych komórek w krwi obwodowej w tej samej grupie w 7 dniu badania świadczy natomiast o proliferacji limfocytów T oraz nasileniu odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez obce antygeny wprowadzone *in ovo*. Wysoki odsetek komórek z ekspresją CD25⁺ stwierdzony w krwi obwodowej w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly w połączeniu ze wzrostem odsetka komórek z ekspresją CD4⁺ i CD8⁺ potwierdza, że związki te podawane *in ovo* stymulują mechanizmy komórkowe odpowiedzialne za rozpoznawanie i eliminację antygenów. Aktywowane tą drogą limfocyty T będą skutecznie zapobiegały infekcjom środowiskowym u drobiu, co może wpłynąć na poprawę zdrowotności ptaków.

Wykazany w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i probiotyk łącznie z chelatem Zn-Gly wysoki odsetek komórek z ekspresją cząsteczki MHC II⁺ wskazuje na aktywację procesu prezentacji antygenów komórkom efektorowym, zwłaszcza limfocytom Th. Analiza uzyskanych wyników badań pozwala stwierdzić, że podanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego, jak również probiotyku łącznie z chelatem Zn-Gly, poprzez kompleks MHC II⁺, skutecznie aktywuje mechanizmy nadzoru komórkowego w procesach odpowiedzi na antygen, co jest szczególnie widoczne w pierwszym okresie życia piskląt.

Kolejną populacją komórek analizowanych w doświadczeniu były limfocyty T $\text{TCR}\gamma\delta^+$, które u drobiu pełnią liczne funkcje efektorowe i cytotoksyczne uczestnicząc we wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej (Smith i Hayday, 2000). W grupie ptaków, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly wykazaliśmy statystycznie istotny, wysoki odsetek komórek $\text{TCR}\gamma\delta^+$ w krwi obwodowej i w śledzionie w 12 godzinie po wykluciu oraz w krwi obwodowej w 7 dniu życia. Wyniki te wskazują, że wieloszczepowy probiotyk podawany *in ovo* stymuluje i promuje komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej będącej reakcją na antygeny mikrobiomu. Zastanawiający jest natomiast brak różnic w odsetku tych komórek w śledzionie w 7 dniu życia pomiędzy grupami doświadczalnymi i kontrolną. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest migracja tych komórek do błony śluzowej, głównie przewodu pokarmowego oraz ich udział w procesach rozpoznawania i likwidacji antygenów.

W doświadczeniu wykonaliśmy także analizę odsetka limfocytów Bu-1A^+ w krwi obwodowej i śledzionie, która wykazała, we wszystkich grupach doświadczalnych w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu badania, wysokie wartości badanego parametru, przy czym w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly odsetek tych komórek był największy. Dane te dowodzą, że wieloszczepowy probiotyk i chelat Zn-Gly stymulują humoralne mechanizmy immunologiczne poprzez produkcję aktywnych limfocytów B i syntezę przeciwciał. Należy założyć, że wysoka ekspresja cząsteczki Bu-1A^+ na limfocytach B w krwi obwodowej i śledzionie drobiu świadczy o stymulacyjnej roli probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly względem odpowiedzi humoralnej, odpowiedzialnej m.in. za eliminację antygenów wnikających do organizmu. Należy podkreślić, że stymulacja układu immunologicznego przy użyciu probiotyku wieloszczepowego pozytywnie oddziałuje na proces selekcji limfocytów i ich dojrzewanie w węzłach chłonnych oraz przyczynia się do powstawania komórek plazmatycznych i limfocytów B pamięci. Ponadto, jak wykazały wcześniej opublikowane wyniki badań, stosowanie chelatów i innych organicznych form Zn pobudza u brojlerów proliferację i różnicowanie limfocytów B na skutek aktywacji cytokinowej oraz powoduje zmiany w narządach limfatycznych grasicy, śledziony i torby Fabrycjusza, co przemawia za stymulacją humoralnych i komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej (Bartlett i Smith, 2003; Jasim i Al-Qaisy, 2019). Należy zatem przyjąć, że łączne stosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly, poprzez aktywację komórek Th1 i uwalnianie cytokiny pobudza odpowiedź typu Th2, co łącznie prowadzi do ograniczenia natężenia procesów zapalnych i wspomagania humoralnej odpowiedzi immunologicznej przy równoczesnym hamowaniu odpowiedzi typu Th1.

Analizowanym w doświadczeniu markerem komórek B była cząsteczka CD79A⁺, która jest integralnym białkiem błonowym, ulegającym ekspresji we wczesnym etapie rozwoju limfocytów B, poprzedzającym ekspresję CD19⁺ (Mason i in., 1995). Ekspresja tego markera jest specyficzna dla limfocytów B i odgrywa ważną rolę w rozwoju, przeżywaniu i aktywacji tej subpopulacji komórek (Lai i in., 2000). Istotne różnice w ekspresji tej cząsteczki w śledzionie stwierdzono dopiero w 7 dniu życia piskląt. Wysoką ekspresję CD79A⁺ w grupie ptaków, które otrzymały *in ovo* chelat Zn-Gly, można wytłumaczyć oddziaływaniem cynku skumulowanego w narządach ptaków i wpływającego na procesy rozwojowe limfocytów B. Podaż wysoce biodostępnego chelatu cynku *in ovo* może zatem wpływać na proliferację limfocytów B i humoralne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej (Anzilotti i in., 2019). Potwierdza to analiza ekspresji cząsteczki Bu-1A⁺, której wyższe wartości stwierdzono w tej grupie w 7 dniu życia, tak w śledzionie jak i w krwi obwodowej. Odmienne kształtowała się ekspresja CD79A⁺ w grupie II i III, w których podawano *in ovo* odpowiednio probiotyk wieloszczepowy i probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly. W 7 dniu życia piskląt w śledzionie stwierdzono niższą ekspresję tej cząsteczki w obu grupach doświadczalnych, natomiast w krwi obwodowej nie wykazano różnic w wartościach badanego parametru między grupami. Można domniemywać, że w doświadczeniu dochodziło do biosorpcji jonów Zn przez biomasę mikroorganizmów dostarczonych w preparacie probiotycznym i w konsekwencji do stopniowego uwalniania pierwiastka i wchłaniania w jelicie. Może to świadczyć także o ograniczeniu procesu różnicowania limfocytów B pod wpływem różnych szczepów drobnoustrojów zawartych w probiotyku podawanym *in ovo*.

Spośród wrodzonych elementów systemu obrony organizmu przed patogenami szczególne znaczenie przypisywane jest makrofagom (Qureshi i in., 2000), które oprócz funkcji komórek prezentujących antygen eliminują patogeny poprzez fagocytozę i pośrednio poprzez regulację odpowiedzi innych komórek immunokompetentnych. Statystycznie istotny, wysoki odsetek komórek KUL01⁺ w krwi obwodowej i w śledzionie stwierdzono w 12 godzinie po wykluciu w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Wyniki te stanowią potwierdzenie badań opublikowanych przez Alizadeh i in. (2021), którzy wykazali, że podanie *in ovo* pałeczek kwasu mlekowego zwiększa pulę komórek KUL01⁺ w śledzionie. Stwierdzona w badaniach wysoka ekspresja cząsteczki KUL01⁺ i Bu-1A⁺ w 12 godzinie po wykluciu w grupie, w której podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly dowodzi, że suplementy te wyzwalają aktywność fagocytarną makrofagów, uczestniczą w prezentacji antygenów zawartych w probiotyku innym komórkom immunokompetentnym i stymulują produkcję przeciwciał. Aktywowane fagocyty, działając niespecyficzenie, chronią przed

czynnikami inwazyjnymi także poprzez prezentację antygenów limfocytom T i stymulację komórkowych mechanizmów obronnych. Przekłada się to na zwiększenie odporności organizmu na zakażenie i poprawę parametrów zdrowotnych w pierwszych dniach życia piskląt. W doświadczeniu wykazano także, że łączona suplementacja probiotykiem wieloszczepowym i chelatem Zn-Gly zmniejsza odsetek komórek KUL01⁺ w śledzionie w 7 dniu życia w porównaniu z grupami, które otrzymywały sam probiotyk wieloszczepowy lub chelat Zn-Gly, co sugeruje immunoregulacyjną funkcję cynku i probiotyku wieloszczepowego w przypadku ich łącznego podawania. Odmienne wyniki uzyskaliśmy w odniesieniu do krwi obwodowej, gdzie najwyższy odsetek komórek KUL01⁺ w 7 dniu badania wykazaliśmy w grupie kurcząt, które otrzymywały chelat Zn-Gly. Należy jednak zaznaczyć, że cynk oddziałuje na różne komórki układu immunologicznego, w tym na liczbę i funkcje komórek żernych, neutrofilów, monocytów i makrofagów biorących udział w procesie fagocytozy (Gao i in., 2018), dlatego suplementacja chelatów Zn-Gly poprzez zwiększenie odsetka fagocytykujących monocytów i heterofili pobudza nieswoiste mechanizmy obronne organizmu.

Praca II

5.2. „*Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks.*”

W okresie 21 dni rozwoju zarodka kurzego zachodzą w nim intensywne przemiany metaboliczne, warunkujące prawidłowy wzrost i rozwój w okresie embrionalnym oraz wpływające na żywotność i zdrowie piskląt po wykluciu (Givisiez i in., 2020). Szczególne znaczenie przypisywane jest zmianom w metabolizmie lipidów w ostatnim okresie rozwoju embrionalnego, prowadzącym do rozwoju stresu oksydacyjnego (Dennerly, 2007; Cherian, 2015; Shokraneh i in., 2020). W tym czasie zarodek wykorzystuje kwasy tłuszczowe, pochodzące z procesu utleniania lipidów żółtka, jako źródło energii do syntezy hormonów, błon strukturalnych, a także do namnażania i wzrostu komórek (Speake i in., 1998a,b; Surai i in., 1999, 2016). Utrzymanie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej przy wykorzystaniu naturalnych przeciwutleniaczy warunkuje ogólną zdrowotność piskląt i w efekcie decyduje o opłacalności hodowli drobiu (Yigit i in., 2014; Surai i in., 2016). Stres oksydacyjny i produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) są ściśle związane z procesami rozwojowymi zarodka kurzego poprzez uczestniczenie w zjawiskach apoptozy komórek, różnicowania komórkowego i powstawania tkanek (Surai, 1999; Shokraneh i in., 2020; Shehata i in., 2021). Jednak nadmierny stres oksydacyjny prowadzi do embriotoksyczności (Surai, 2000; Dennerly, 2007; Wang i in., 2010, Malheiro i in., 2012), do której może dochodzić m.in. pod wpływem podawania *in ovo* różnych związków, takich jak badany w doświadczeniu probiotyk wieloszczepowy, zawierający szczepy *Lactobacillus* i *Sacharomyces* i chelat Zn-Gly. Celem badań przedstawionych w pracy pod tytułem „Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks” było określenie wpływu skojarzonego stosowania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy i chelatu Zn-Gly na kształtowanie się całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (T-AOC), stężenie grup sulfhydrylowych (SH), mostków bityrozynowych, formylokinureniny, wodoronadtlenków i białka w surowicy, wątrobie, jelicie cienkim, sercu i mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu życia oraz dodatkowo w woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wykluciu. Analogicznie, w tych samych terminach oznaczano stężenie katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), kortykosteronu (CORT),

cytokin pro- i przeciwzapalnych, TNF- α , IFN- β , IL-6, IL-10 i białka szoku cieplnego 70 (HSP70) w surowicy, wątrobie, jelicie cienkim i grubym i w woreczku żółtkowym kurcząt.

5.2.1. Ocena stężenia cytokin

Potencjał immunomodulacyjny probiotyków, zwłaszcza wieloszczepowych, cechujących się zróżnicowanym oddziaływaniem na komórkę oraz cynku oparty jest na utrzymywaniu w organizmie równowagi immunologicznej Th1/Th2 przy współdziale komórek Th0, Th17 i komórek regulatorowych Treg (de Roock i in. 2010). Oddziaływanie tych preparatów na komórki tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego (GALT) prowadzi do modulacji funkcji limfocytów T i B oraz pobudza komórki immunokompetentne do produkcji cytokin (Mazziotta i in., 2023). Aktywowane cytokiny wzmagają, obniżają lub regulują ogólną i lokalną odpowiedź immunologiczną. Wykorzystana w badaniach metoda *in ovo* podawania probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly stanowi skuteczny sposób wczesnego zasiedlania przewodu pokarmowego pożytecznymi bakteriami oraz zwiększa możliwość oddziaływania Zn na komórki rozwijającego się organizmu, co wpływa na miejscową i ogólną komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną, chroniąc organizm przed zakażeniem (Fathi i in., 2018; Alizadeh i in., 2021). Z danych piśmiennictwa wynika, że cynk odgrywa istotną rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu Th1 (Hojyo i Fukada, 2016; Jarosz i in., 2017a,b). Potwierdzają to uzyskane wyniki badań, w których po podaniu *in ovo* chelatu Zn-Gly wykazaliśmy w 12 godzinie po wykluciu wysokie stężenie TNF- α w woreczku żółtkowym, surowicy, jelicie cienkim i grubym oraz IFN- γ w woreczku żółtkowym i surowicy. W 7 dniu życia ptaków wyższe stężenie TNF- α w porównaniu do kontroli i pozostałych grup doświadczalnych stwierdzono jedynie w surowicy i wątrobie. Wykazana w 12 godzinie życia piskląt stymulacja produkcji IFN- γ w komórkach i uwalnianie go do surowicy świadczą o pobudzeniu limfocytów T, które zwiększają swoją aktywność cytotoksyczną i promują komórkowy fenotyp odpowiedzi Th1. Podobnie, TNF- α indukuje komórkowy fenotyp odpowiedzi typu Th1 oraz uczestniczy w regulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu wystawionego w okresie bezpośrednio po wyłęgu na działanie negatywnych bodźców środowiskowych. Wysokie stężenie TNF- α w surowicy może być także związane z indukowaną apoptozą szybko dzielących się komórek enterocytarnych w odpowiedzi na zasiedlanie przewodu pokarmowego drobnoustrojami (Ruder i in., 2019), co potwierdza niskie stężenie IFN- γ w tkankach jelit. Nie można także wykluczyć, że kompleks glicynowy cynku zwiększający wchłanianie pierwiastka przez ścianę jelit może po podaniu *in ovo* wpływać na integralność bariery nabłonkowej jelit prowadząc do rozwoju

szybko przemijającego stanu zapalnego. Za procesami immunoregulacji w odpowiedzi na chelat Zn-Gly, ograniczającymi możliwość wystąpienia stanu zapalnego przemawia także wysokie stężenie IL-10 stwierdzone w surowicy w 12 godzinie po wykluciu. Cytokina ta modyfikuje odpowiedź immunologiczną poprzez bezpośredni wpływ na limfocyty T, hamowanie syntezy cytokin prozapalnych i ograniczenie odpowiedzi immunologicznej typu Th1 (Trinchieri, 2007). Odmienne wyniki uzyskaliśmy w przypadku zastosowania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego. W tej grupie ptaków wysokie stężenie IFN- γ wykazaliśmy jedynie w 12 godzinie po wykluciu w woreczku żółtkowym i wątrobie. Podobnie, w przypadku TNF- α uzyskane wyniki nie różniły się statystycznie pomiędzy grupami lub były istotnie niższe w surowicy, jelicie cienkim i wątrobie w porównaniu do grupy kontrolnej. Opublikowane wyniki badań jednoznacznie wskazują, że suplementacja *in ovo* probiotyków pobudza humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną poprzez regulację ekspresji genów cytokin. Korelując wykazany w badaniach wzrost ekspresji cząsteczki KUL01⁺ na monocytach i makrofagach w śledzionie i krwi obwodowej ze stężeniem cytokin prozapalnych, głównie TNF- α należy domniemywać, że pod wpływem podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly dochodzi do wzmożonej prezentacji antygenów bakteryjnych i powstawania komórek prezentujących antygen, które sprawują kontrolę odpowiedzi immunologicznej wobec antygenów środowiskowych i eliminują niektóre drobnoustroje chorobotwórcze, wzmacniając odporność ptaków na zakażenie.

5.2.2. Ocena stężenia enzymów antyoksydacyjnych

Enzymy antyoksydacyjne, m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i katalaza (CAT) stanowią pierwszą linię obrony przed ROS (Surai i in., 2016). Dzięki katalizowaniu procesów usuwania rodników ponadtlenkowych kontrolują one zjawisko stresu oksydacyjnego w komórce (Fridovich, 1983). W badaniach wykazano wysokie stężenie SOD w jelicie cienkim i grubym kurcząt w 12 godzinie po wykluciu w grupach ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy oraz jelicie cienkim i woreczku żółtkowym ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i Zn-Gly. W przypadku CAT wysokie stężenie tego enzymu stwierdzono w 12 godzinie po wykluciu w jelicie cienkim ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly oraz sam chelat Zn-Gly. Analogiczny wynik uzyskano w odniesieniu do jelita grubego ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy lub Zn-Gly. Dane te wskazują na występowanie stresu oksydacyjnego wywołanego podrażnieniem nabłonka jelit przez zasiedlające go drobnoustroje zawarte w probiotyku wieloszczepowym oraz wchłanianiem wysoce biodostępnego chelatu cynku. Wang i in. (2012) i Hou i in. (2014) w badaniach na modelu świni i myszy wykazali, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zwiększają

koncentrację SOD1 w jelitach, zmniejszając w ten sposób stężenie ROS i ograniczając stres oksydacyjny. Ponadto wykazano, że komórki *Lactobacillus* mają zdolność przeżywania w obecności nadtlenu wodoru, który wytwarzają i który hamuje wzrost mikroorganizmów patogennych (Reis i in., 2012). Dzięki tej właściwości podanie *in ovo* bakterii z rodzaju *Lactobacillus* ogranicza zjawisko stresu oksydacyjnego u kurcząt po wykluciu i w trakcie dalszego rozwoju. Zastosowany w doświadczeniu probiotyk wieloszczepowy zawiera mieszaninę pożytecznych drobnoustrojów, m.in. *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei*, a zatem wykazane po wykluciu wyższe stężenie SOD w jelitach można traktować jako efekt oddziaływania tych drobnoustrojów. Suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym przyczynia się do kolonizowania przewodu pokarmowego rozwijającego się zarodka, co oddziałuje antyoksydacyjnie oraz, biorąc pod uwagę stężenia badanych cytokin, moduluje odpowiedź immunologiczną typu Th1 i Th2. Warto podkreślić, że w 7 dniu życia piskląt otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i Zn-Gly stężenie SOD w jelitach było wyższe niż w grupie kontrolnej. Wobec braku zmian stężenia SOD w innych narządach i w surowicy zjawisko to należy wiązać z lokalną produkcją SOD w jelitach w efekcie drażniącego oddziaływania chelatu glicynowego cynku na enterocyty lub zmian w mikrobiomie jelitowym, zachodzących pod wpływem drobnoustrojów probiotycznych i środowiskowych. Uzyskane wyniki wskazują na potencjał ochronny organizmu w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany przez drobnoustroje zasiedlające przewód pokarmowy kurcząt, a także sugerują, że w okresie intensywnego wzrostu piskląt dochodzi do przebudowy i zmian w komórkach enterocytów. Stwierdzone w doświadczeniu, w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy, wysokie stężenie SOD w woreczku żółtkowym przy braku zmian stężenia CAT może być skutkiem oddziaływania drobnoustrojów zawartych w probiotyku wieloszczepowym na procesy utleniania lipidów. Analiza stężenia SOD w surowicy w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly nie wykazała natomiast istotnych różnic pomiędzy grupami w 7 dniu życia ptaków. Dane te dowodzą, że w organizmie nie toczą się procesy zapalne i nie oddziałują na organizm nadmierne reakcje stresowe, np. stres cieplny, które mogłyby wpływać na stężenie SOD (Huang i in., 2015). Brak różnic w stężeniach SOD i CAT w 7 dniu życia w surowicy i wątrobie piskląt z analizowanych grup dowodzi braku aktywacji systemu antyoksydacyjnego, co może negatywnie wpłynąć na wychwytywanie i detoksykację ROS oraz potwierdza, że badane preparaty są bezpieczne w stosowaniu *in ovo*, nie aktywują mechanizmów stresu oksydacyjnego i nie prowadzą do uszkodzenia tkanek. Warto podkreślić, że stres związany z procesem klucia także nie wpływał na stężenie SOD i CAT w surowicy i wątrobie, co potwierdza

ochronne działanie suplementów stosowanych *in ovo*. Interesujące wyniki uzyskano w badaniach wykonanych w 7 dniu życia kurcząt, u których w wątrobie wykazano istotnie wyższe stężenie SOD jedynie w grupie kontrolnej, co przemawia za aktywacją tego enzymu w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

5.2.3. Ocena układu oksydacyjno-antyoksydacyjnego

Do oceny potencjału antyoksydacyjnego komórek wykorzystuje się oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej T-AOC (Ghiselli i in., 2000; Hegde i in., 2013; Peluso i Roguzzini, 2016), która jest użytecznym narzędziem w ocenie znaczenia przeciwutleniającego różnych związków stosowanych u drobiu jako suplementy żywieniowe. Wyniki badań wykazały, że zastosowanie probiotyku wieloszczepowego bez lub z jednoczesnym podaniem chelatu Zn-Gly zwiększa T-AOC w tkankach jelita cienkiego w 12 godzinie po wykluciu, natomiast nie wykazano zmian T-AOC w wątrobie i surowicy. Ponadto, w badaniach wykazano obniżenie T-AOC w tkance mięśniowej i w sercu. Wyniki te sugerują, że mimo podawania badanych preparatów *in ovo* w organizmie nie dochodzi do zaburzenia równowagi procesów oksydacyjnych i antyoksydacyjnych i nie toczą się procesy zapalne związane ze stresem oksydacyjnym. Opublikowane dotychczas wyniki badań wskazują, że bakterie kwasu mlekowego mogą wpływać na aktywność i stężenie enzymów antyoksydacyjnych w organizmie oraz zmniejszać uszkodzenia w jelicie spowodowane stresem oksydacyjnym (Bai i in., 2018; Yu i in., 2019; Zhang i in., 2021). Stwierdzony w badaniach znaczny wzrost T-AOC w tkance jelit w grupach ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly wskazuje, że bakterie probiotyczne zawarte w preparacie wywierają wpływ przeciwutleniający na komórki enterocytarne ulegające szybkim podziałom podczas wzrostu i rozwoju organizmu. Wysoka aktywność T-AOC w woreczku żółtkowym wskazuje, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly współtworzą mechanizmy ochrony antyoksydacyjnej z substancjami przeciwutleniającymi i enzymami antyoksydacyjnymi zawartymi w jajach.

Jedną z istotnych metabolicznych konsekwencji iniekcji *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly było obniżenie stężenia kortykosteronu w woreczku żółtkowym i surowicy w 12 godzinie po wykluciu oraz w surowicy i wątrobie w 7 dniu życia. Dzięki aktywności antyoksydacyjnej obydwu preparatów podawanych *in ovo* wolne rodniki mogą być skutecznie wymiatane, a zarodek kurzy jest mniej narażony na uszkodzenia oksydacyjne. Złagodzenie stresu w wyniku ich podania prowadzi do zmniejszenia stymulacji osi przysadka-podwzgórze-nadnercza (HPA) i w konsekwencji do zahamowania wydzielania kortykosteronu. In-

interesujące jest zatem wykazane w badaniach wysokie stężenie kortykosteronu w surowicy, jelicie cienkim i woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wykluciu w grupach otrzymujących chelat Zn-Gly. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że niskie stężenie glukokortykoidów związane jest zwykle z wysokim stężeniem białka całkowitego we krwi, co potwierdził w swoich badaniach Kucuk i in. (2003). W naszym doświadczeniu stężenie białka w surowicy i tkankach było jednak niższe lub porównywalne do grupy kontrolnej. Dane te dowodzą przypuszczalnego wyższego zapotrzebowania kurcząt w badanych grupach na energię użyteczną metabolicznie, wykorzystywaną do zwiększenia syntezy białka niezbędnego do wzrostu organizmu lub ochrony przed działaniem stresu oksydacyjnego.

Jednym z ważnych markerów reakcji stresowej organizmu jest też białko szoku cieplnego Hsp 70. Różnorodne czynniki stresowe odpowiedzialne za uszkodzenia oksydacyjne tkanek indukują uwalnianie ROS, Hsp70 i kortykosteronu (Mahmoud i in., 2004). W badaniach wykazaliśmy wysokie stężenie Hsp70 w 12 godzinie po wykluciu w jelicie cienkim ptaków z grupy ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. W przypadku jelita grubego i surowicy w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu życia stężenie Hsp70 było istotnie wyższe w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* chelat Zn-Gly. Wykazane w badaniach wyższe stężenia Hsp70, zwłaszcza w jelitach dowodzi, że suplementacja *in ovo* cynku w połączeniu z glicyną prowadzi do nadmiernej kumulacji pierwiastka w tkance jelit oraz do zmian metabolicznych w enterocytach i wywołania reakcji stresowej w następstwie szybkiej proliferacji komórek. Dane te w korelacji ze stężeniami cytokin typu Th1 i Th2 sugerują, że w organizmie nie dochodzi do lokalnych procesów zapalnych, natomiast stwierdzone zmiany są przypuszczalnie efektem działania drażniącego i kumulacji cynku w nabłonku jelit. Zastosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego sprawia ponadto, że dostarczane w ten sposób drobnoustroje wchodzi w interakcje z mikroorganizmami stanowiącymi mikrobiom jelitowy i zasiedlającymi jelita od momentu wyklucia, co może powodować także przejściowe reakcje stresu oksydacyjnego w komórkach nabłonkowych. Interakcje te promują zjawisko homeostazy mikrobiologicznej jelit wpływając na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach nabłonkowych i przyczyniając się do poprawy wchłaniania składników odżywczych, w tym składników mineralnych, takich jak cynk. Zestawiając uzyskane wyniki badań dotyczących stężenia Hsp70, kortykosteronu i produktów peroksydacji kwasów tłuszczowych (DEPPD) w surowicy i tkankach należy domniemywać, że zastosowanie *in ovo* chelatu Zn-Gly prowadzi do przejściowej reakcji stresowej u nowo wyklutych piskląt, będącej efektem oddziaływania wysoce biodostępnego, łatwo wchłanialnego cynku w formie organicznej.

Oprócz lipidów na działanie wolnych rodników w dużym stopniu podatne są także białka. Procesy oksydacyjne zachodzące w białkach, gromadzenie się utlenionych produktów białkowych, fragmentacja i agregacja białek oraz modyfikacja reszt aminokwasowych upośledzają funkcje komórki prowadząc ostatecznie do jej śmierci (Martemucci i in., 2022). W wyniku stresu oksydacyjnego, spowodowanego działaniem wolnych rodników, procesom utlenienia ulegają grupy sulfhydrylowe (–SH) białek, z których następnie powstają rodniki tiolowe (RS-) i disulfidy (Baba i Bhatnagar, 2018). Najczęściej utlenieniu ulega cysteina, zawierająca w strukturze grupy –SH, co skutkuje modyfikacjami białek zawierających w składzie ten aminokwas (Baba i Bhatnagar, 2018). Zjawisko to przyczynia się do utraty aktywności białek pełniących różnorodne funkcje, w tym regulatorowe, transportowe i enzymatyczne (Baba i Bhatnagar, 2018). Włączona do badań ocena i analiza stężenia grup –SH pozwoliła na określenie intensywności procesu oksydacyjnego uszkodzenia białek w organizmie. Wykazane w badaniach w grupach doświadczalnych wysokie stężenie grup –SH w 12 godzinie po wykluciu w narządach takich jak wątroba, jelito cienkie i mięśnie piersiowe wskazuje, że zastosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly stanowi silną obronę antyoksydacyjną, chroniącą zarodek i nowo wyklute pisklę przed czynnikami uszkodzającymi zewnątrz- i wewnątrzpochodnymi. Wyższe stężenie grup –SH w tym okresie może wskazywać także na intensywne procesy regeneracji cząsteczek białek lub ich wzmożoną syntezę, co jest związane z rozwojem nowo wyklutego pisklęcia i intensywnym wzrostem oraz aktywowaniem obrony antyoksydacyjnej zapewniającej ochronę przed infekcjami wywoływanymi przez drobnoustroje środowiskowe. Niskie stężenie grup –SH stwierdzono natomiast w 12 godzinie po wykluciu w woreczku żółtkowym i w surowicy w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly oraz w surowicy w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly. Wyniki te wskazują na występowanie stresu oksydacyjnego, który mógł pojawić się już na ostatnim etapie rozwoju zarodkowego przed kluciem, kiedy zarodek wykorzystuje ostatnie zasoby energetyczne żółtka i nasila procesy kataboliczne (Guérin i in., 2021). Alternatywnie, stres oksydacyjny może być efektem samego procesu klucia, który potęguje to zjawisko i zwiększa mobilizację organizmu w celu przeżycia tego etapu i adaptacji nowo wyklutego pisklęcia do warunków środowiskowych. W tym okresie mogą zachodzić procesy dezintegracji i rozpadu białek wykorzystywanych do przeżycia organizmu w tzw. oknie lęgowym, w którym nowo wyklute pisklę nie otrzymuje jeszcze karmy (Li i in., 2022). Wyższe stężenie grup –SH w woreczku żółtkowym stwierdzono jedynie w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly, co potwierdza znaczenie wysoce biodostępnego cynku w postaci chelatów dla procesów syntezy białek.

Jednym z ubocznych efektów oddziaływania wolnych rodników na komórkę jest degradacja białek, zwłaszcza zawierających reszty tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny (Goldstein i in., 1994; Gatin i in., 2021).. Wykazano, że stężenie bi-tyrozyny może być traktowane jako marker zaburzeń procesów oksydacyjnych (Gatin i in., 2021). W badaniach wykazaliśmy wysokie stężenie bi-tyrozyny w 12 godzinie po wykluciu w woreczku żółtkowym, surowicy, sercu i jelicie cienkim ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Dowodzi to, że drobnoustroje zawarte w tym preparacie w trakcie zasiedlania przewodu pokarmowego oddziałują lokalnie na nabłonek jelitowy, co może prowadzić do podrażnienia komórek, ich wzmożonej proliferacji lub procesów apoptozy. Procesy peroksydacji aminokwasów zachodzące w tym okresie wiązać się mogą z intensywnym rozwojem organizmu i są skutkiem rearanżacji białek tworzących poszczególne tkanki. Należy podkreślić, że w wątrobie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly stwierdziliśmy mniejsze stężenie bi-tyrozyny w porównaniu do grupy kontrolnej, co wskazuje na sprawność procesów antyoksydacyjnych komórek i utrzymywanie homeostazy układu redox. Podobnie, wyższe stężenie formylokinureniny, będącej produktem utleniania tryptofanu, wykazaliśmy w 12 godzinie po wykluciu w woreczku żółtkowym we wszystkich grupach doświadczalnych oraz w jelicie cienkim w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Zwiększenie ilości szkodliwych produktów metabolizmu tryptofanu nasila zjawisko stresu oksydacyjnego, które może prowadzić do rozwoju reakcji zapalnej (Hajsl i in., 2020). Takich zmian nie stwierdzono jednak w jelitach w 7 dniu badania, w którym stężenie formylokinureiny w grupach doświadczalnych było niższe lub zbliżone do grupy kontrolnej. Analizując te zależności należy wziąć pod uwagę fakt, że w jelitach zachodzą intensywne procesy podziału enterocytów oraz apoptozy z przebudową białek strukturalnych, co należy łączyć z rozwojem ptaków, skutkującym uszkodzeniami białek i generacją ROS. O lokalnym charakterze tych zmian świadczą niskie stężenia formylokinureiny stwierdzone w wątrobie ptaków w 12 godzinie po wykluciu. Można zatem przyjąć, że suplementy diety wykorzystane w doświadczeniu i podawane *in ovo* działają antyoksydacyjnie, ograniczając procesy utleniania białek.

Skutkiem oddziaływania wolnych rodników na komórkę, obok degradacji białek, jest często degradacja błon komórkowych, w obrębie których uszkodzeniu ulegają najczęściej wielonienasycone kwasy tłuszczowe (Porter, 1986). W celu oceny stopnia uszkodzenia błon komórkowych wykorzystaliśmy w badaniach metodę pośrednią, która polega na monitorowaniu dość trwałego kationorodnika powstającego w reakcji rodników alkoksylowych i nadtlenkowych pochodzących z wodoronadtlenków (DEPPD) (Bielecka i in., 2021). W badaniach wykazano, że w 12 godzinie po wykluciu w surowicy i w sercu ptaków otrzymujących *in ovo* chelat

Zn-Gly oraz w mięśniu piersiowym ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly lub sam chelat Zn-Gly dochodzi do nasilenia peroksydacji lipidów, co może być skutkiem procesów utleniania związanych z odpowiedzią organizmu na intensywny wzrost. Interesujący jest fakt, że w badaniach nie stwierdzono wzrostu peroksydacji lipidów w jelitach w grupach doświadczalnych, a ponadto w wątrobie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly w 7 dniu po wykluciu stwierdzono zmniejszenie nasilenia tego procesu. Uzyskane wyniki dowodzą, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly, stosowane *in ovo*, nie oddziałują drażniąco ani nie wywołują stanu zapalnego jelit chroniąc komórki przed uszkodzeniami. Probiotyk wieloszczepowy, zawierający różne szczepy *Lactobacillus* i *Saccharomyces* oraz chelat Zn-Gly pełnią zatem w organizmie funkcje regulacyjne i zapewniają immunotolerancję w odniesieniu do flory bakteryjnej zasiedlającej przewód pokarmowy piskląt, a także zapobiegają rozwojowi ogólnoukładowego procesu zapalnego.

Praca III

5.3. “*Proteome Changes and Zn Concentration in Chicken Serum and Tissues Following in ovo Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate (Zn-Gly) – Preliminary Research*”

Współczesna produkcja drobiu, w tym zwłaszcza szybko rosnących brojlerów, wymaga dostarczania z paszą odpowiedniej ilości pierwiastków, takich jak Zn, niezbędnych do budowy tkanek i narządów oraz regulacji procesów fizjologicznych, metabolicznych i trawiennych oraz probiotyków wieloszczepowych, które stabilizują procesy trawienne i korzystnie oddziałują na mikrobiom. Wykazano, że cynk i probiotyki wpływają na metabolizm białek, lipidów i węglowodanów w okresie rozwoju zarodkowego i po wylęgu (Givisiez i in., 2020; Banaszak i in., 2021; Gao i in., 2025). Ważną funkcję dla zarodka pełni Zn pochodzący żółtka, który wykorzystywany jest głównie w ostatnim etapie rozwoju embrionalnego (Yair i Uni, 2011). Podanie Zn *in ovo* zwiększa nie tylko jego stężenie w jajach, ale przede wszystkim wpływa na wchłanianie i dystrybucję pierwiastka w narządach zarodka, w których jest on wykorzystywany do budowy tkanek. Celem podjętych badań było określenie stężenia cynku w surowicy i tkankach kurcząt, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i/lub chelat Zn-Gly oraz związanych z suplementacją różnic w proteomie i peptydomie narządów rozwijającego się organizmu.

5.3.1. *Analiza stężenia Zn w surowicy i tkankach kurcząt*

W doświadczeniu wykazaliśmy, że suplementacja *in ovo* chelatem Zn-Gly skutkowałą wzrostem stężenia Zn w surowicy i woreczku żółtkowym w 12 godz. po wykluciu. Wzrost stężenia cynku w woreczku żółtkowym stwierdziliśmy także w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. W obydwu badanych grupach nie wykazaliśmy natomiast zmian w stężeniu Zn w tkance jelit i w wątrobie. Odmienne wyniki uzyskali Radi i in. (2021) i Ramiah i in. (2019), którzy u brojlerów żywionych paszą z dodatkiem nanocząsteczek tlenku cynku (ZnONPs) wykazali wzrost stężenia Zn w surowicy, wątrobie i mięśniach, a stężenie to zwiększało się proporcjonalnie do ilości suplementowanego pierwiastka. Zastosowana w doświadczeniu organiczna forma Zn w postaci chelatu teoretycznie powinna przyczynić się do zwiększenia stężenia tego pierwiastka w narządach, głównie w wątrobie, ponieważ pełni ona funkcję rezerwuaru Zn w organizmie. Należało zatem oczekiwać, że dodatkowa suplementacja Zn wpłynie na zwiększenie magazynowania pierwiastka. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, że podawany *in ovo* chelat Zn-Gly może być wykorzystywany w

całości do intensywnego rozwoju zarodka i wysoka zawartość Zn jedynie w surowicy świadczy o krążeniu pierwiastka w całym organizmie. W tym kontekście nasze wyniki są zgodne z opublikowanymi przez Sun i in. (2018), którzy po podaniu *in ovo* różnych dawek Zn nie wykazali zmian w stężeniu pierwiastka w wątrobie ptaków, natomiast potwierdzili zwiększoną kumulację w kościach, co skutkowało rozwojem tkanki kostnej i poprawą jej mineralizacji. W badaniach wykazano natomiast wzrost stężenia Zn w wątrobie w 7 dniu życia w grupach ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Wyniki te dowodzą, że stężenie cynku w organizmie ptaków pozostaje na poziomie odpowiednim dla prawidłowego rozwoju i przebiegu procesów metabolicznych, natomiast nadmiar pierwiastka jest magazynowany w wątrobie. W interpretacji tych wyników należy uwzględnić fakt, że na procesy kumulacji Zn w organizmie znaczący wpływ mają szczepy bakterii kwasu mlekowego (LAB) zawarte w wieloszczepowym probiotyku (Mohan i in., 2018). Zgodnie z koncepcją biotransformacji minerałów nieorganicznych mikroelementy, takie jak Zn, wiążą się w kompleksy białkowe w biomasie mikrobiomu i dzięki temu są skuteczniej wchłaniane w jelicie (Mrvcic i in., 2009; Mohan i in., 2018). Tym należy tłumaczyć wykazaną w badaniach wysoką koncentrację cynku w wątrobie w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy.

5.3.2. Analiza ekspresji mRNA dysmutazy ponadtlenkowej Cu/Zn SOD

Uzyskane wyniki badań dowodzą, że podanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly przyczynia się do zwiększenia stężenia Zn, który kumuluje się w woreczku żółtkowym i mimo wykorzystywania przez zarodek do budowy tkanek nadal wykrywany jest w dużych ilościach. Należy także przyjąć, że Zn magazynowany w woreczku żółtkowym pełni rolę ochronną w stosunku do embrionu, uczestnicząc w procesach obrony antyoksydacyjnej (Zhang i in., 2022). Jest on bowiem niezbędny do syntezy i funkcjonowania licznych enzymów, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej Cu/Zn SOD, która pełni rolę ochronną przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Noor i in. 2002). Wykazano, że suplementacja Zn powoduje wzrost ekspresji mRNA Cu/Zn SOD w wątrobie oraz zwiększa jej aktywność u brojlerów (Liu i in., 2015), niosek (Li i in., 2019; Yu i in., 2020) i innych gatunków zwierząt, np. świń (Wang i in., 2012a). Analizując wyniki badań, uzyskane metodą SDS-PAGE i Western blot potwierdziliśmy obecność Cu/Zn SOD w wątrobie, jelitach cienkich i grubych we wszystkich grupach doświadczalnych i w kontrolnej w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu życia piskląt. Stosując dodatkowo analizę żeli poliakrylamidowych z użyciem programu GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com, by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc) największą ekspresję Cu/Zn SOD wykazaliśmy w jelicie cienkim i grubym w 12 godzinie po wykluciu w grupach

ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly oraz sam chelat Zn-Gly. W 7 dniu życia ptaków największą ekspresję Cu/Zn SOD wykazaliśmy natomiast w jelicie cienkim ptaków otrzymujących łącznie probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly i w jelicie grubym ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly. Widoczne w doświadczeniu wysokie stężenie Cu/Zn SOD w jelicie cienkim piskląt w pierwszym okresie życia po wykluciu znajduje potwierdzenie w badaniach Tang i in., 2019 którzy wykazali, że jelito cienkie charakteryzuje się wyższą aktywnością SOD w porównaniu do innych narządów. Istotna rola SOD w jelitach sprowadza się do ochrony przewodu pokarmowego po wykluciu przed działaniem wolnych rodników oraz procesami utleniania licznych białek i enzymów (Tang i in., 2019). To działanie antyoksydacyjne przyczynia się do zachowania homeostazy w szybko rozwijających się komórkach jelita, narażonych w pierwszym okresie życia na kolonizację drobnoustrojami chorobotwórczymi pochodzącymi ze środowiska. Zastosowane w doświadczeniu probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly współtworzą mikrobiom jelit, a zwiększona biomasa bakterii zapewnia lepsze wchłanianie i pośredniczy w dystrybucji Zn do komórek enterocytów. W doświadczeniu nie wykazaliśmy natomiast różnic w ekspresji Cu/Zn SOD w wątrobie i wyniki te są zgodne z badaniami stężenia cynku w tym narządzie, w którym w 12 godzinie po wykluciu nie wykazano różnic statystycznych w stężeniu tego pierwiastka. Za prawdopodobną przyczynę tego zjawiska należy przyjąć redystrybucję Zn do innych narządów i organów ulegających intensywnemu wzrostowi i rozwojowi w tym okresie życia. Zaskakujący jest fakt, że mimo znaczącej ilości Zn w woreczku żółtkowym w metodzie Western blot nie wykazaliśmy obecności Cu/Zn SOD. Należy przyjąć, że tłuszcze obecne w dużych ilościach w woreczku żółtkowym utrudniają rozdział elektroforetyczny białek czyniąc tę metodę nieadekwatną do pomiaru stężenia białka w woreczku żółtkowym.

5.3.3. Analiza proteomu i peptydomu tkanek kurcząt

Porównując intensywność widm masowych uzyskanych przy wykorzystaniu spektrometrii mas MALDI-TOF zidentyfikowaliśmy 12 białek różnicujących grupy ptaków, którym suplementowano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy z/bez chelatu Zn-Gly. Analiza spektrum masowego białek wątroby wykazała ekspresję białka MHC klasy I o masie 7052 Da we wszystkich grupach doświadczalnych i w kontrolnej w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu życia, przy czym była ona najwyższa w 7 dniu życia w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Cząsteczki MHC klasy I są obecne na większości komórek jądrzastych, a ich podstawową funkcją jest uczestnictwo w prezentacji peptydów limfocytom cytotoksycznym T CD8⁺ (Silva i Gallardo, 2020). Według Miller i Taylor (2016), wysoka ekspresja MHC klasy I u kurcząt koreluje z opornością na choroby zakaźne. Wykazana w badaniach wyższa ekspresja

tego białka w 7 dniu życia piskląt ma związek z pobudzeniem układu immunologicznego w życiu embrionalnym, z odpowiedzią organizmu na antygeny środowiskowe zasiedlające organizm po wykluciu, a także ze szczepieniami przeciwko chorobom zakaźnym, wykonywanymi po wylęgu. Najwyższa ekspresja MHC klasy I stwierdzona w tej grupie ptaków wskazuje, że suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym, poprzez dodatkową podaż antygenów bakteryjnych zawartych w probiotyku, pobudza odpowiedź immunologiczną w zakresie prezentacji antygenów i promuje aktywację limfocytów T.

Analiza MALDI-TOF MS tkanki wątrobowej wykazała we wszystkich grupach doświadczalnych i w kontrolnej w 12 godzinie po wykluciu ekspresję izoenzymu aminopeptydazy wrażliwej na puromycynę (PSA-II – puromycin-sensitive aminopeptidase isozyme II) o masie 2159 Da. PSA-II jest metalopeptydazą Zn^{2+} występującą w cytoplazmie komórek różnych tkanek i narządów, głównie mózgu (Karsten i in., 2006; Menzies i in., 2010). Jej funkcja polega na trawieniu krótkich peptydów (Bhutani i in., 2007) do aminokwasów, które następnie jako antygeny są prezentowane cząsteczkom MHC klasy I (Stoltze i in., 2000). Identyfikacja tego białka dowodzi, że w okresie powylęgowym dochodzi do aktywacji odpowiedzi immunologicznej, mającej wpływ na odporność ptaków w późniejszym okresie życia. Można założyć, że suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i chelatem Zn-Gly dodatkowo pobudza ten proces. Zastanawiający jest natomiast brak ekspresji tego białka w wątrobie w 7 dniu życia, co może być związane z występowaniem tego izoenzymu w innych tkankach, np. w mózgu, jak wykazali Hui i in. (1993).

W 12 godzinie po wykluciu w wątrobie ptaków, które otrzymywały chelat Zn-Gly lub Zn w połączeniu z probiotykiem wieloszczepowym zidentyfikowaliśmy także białko transtyretynę (TTR - transthyretin) o masie 1116 Da. Uzyskany w badaniach sygnał, świadczący o syntezie tego białka w analizowanych grupach ptaków, jest przypuszczalnie związany z suplementacją łatwo wchłanialnej organicznej postaci Zn. Białkiem, w stosunku do którego stwierdziliśmy także zmianę ekspresji w analizie MALDI-TOF MS jest amidopodobny neuropeptyd FMRF (amide-like neuropeptide, LPLRF-amide) o masie 645 Da. Wykazaliśmy, że białko to występuje w wątrobie ptaków ze wszystkich grup doświadczalnych oraz z kontrolnej, tak w 12 godzinie po wykluciu jak i w 7 dniu życia. Interesujące w tych badaniach jest widoczne przesunięcie piku identyfikującego to białko w 7 dniu życia w kierunku większych mas, co może świadczyć o modyfikacjach postranslacyjnych, zachodzących w trakcie fizjologicznego rozwoju kurcząt. Warto podkreślić, że neuropeptydy te występują tak w ośrodkowym jak i w obwodowym układzie nerwowym pełniąc rolę neuroprzekąźnikową i neuromodulacyjną (Loi i Tublitz, 2000; Tarr i in., 2020). Wykazany w badaniach wzrost ekspresji tego białka może zatem świadczyć o aktywacji procesów neurotransmisji i neuromodulacji w szybko dzielących się komórkach rozwijającego się organizmu kurcząt.

Badanie tkanek jelita cienkiego metodą MALDI-TOF MS wykazało, w 12 godzinie po wykluciu, obecność charakterystycznego białka serglicyny (SG) o masie 14069 Da. Białko to zidentyfikowano u ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly, sam chelat Zn-Gly oraz u ptaków z grupy kontrolnej. Serglicyna jest hematopoetycznym proteoglikanem o różnorodnych funkcjach zależnych od komórek, w których jest syntetyzowana (Schick i in. 2001). Serglicyna ulega ekspresji głównie w komórkach hematopoetycznych, np. w komórkach tucznych, neutrofilach i limfocytach cytotoksycznych, ale także w komórkach śródbłonna i nabłonka, gdzie uczestniczy w wydzielaniu cytokin w procesach odpowiedzi immunologicznej (Reine i in., 2014). Wysoka ekspresja tego białka stwierdzona u ptaków z wymienionych grup może być związana z podażą łatwo wchłanialnego chelatu Zn, który powoduje aktywację limfocytów zaangażowanych w odpowiedzi typu komórkowego oraz cytokin proliferacyjnych uwalnianych w jelitach (Jarosz i in., 2017a,b), lub może wskazywać na rozwijający się proces zapalny w obrębie jelit, będący skutkiem drażniącego oddziaływania nadmiaru Zn na szybko dzielące się komórki enterocytarne. Warto podkreślić, że największa ekspresja tego białka stwierdzana była w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly co wskazuje, że drobnoustroje probiotyczne ułatwiają wchłanianie pierwiastków, w tym cynku. Nie wykazano natomiast ekspresji tego białka u kurcząt, które otrzymywały jedynie probiotyk wieloszczepowy co dowodzi, że szczepy zawarte w probiotyku stabilizują środowisko jelit utrzymując w nim homeostazę. Innym białkiem zidentyfikowanym w jelitach cienkich ptaków w 12 godzinie po wykluciu, jedynie w grupie kontrolnej, jest insulina 2 (Insulin 2) o masie 5065 Da. Ekspresja tego białka może być związana z większym zapotrzebowaniem komórek na substraty energetyczne niezbędne do wzrostu i rozwoju (Boucher i in., 2014). Brak ekspresji tego białka w grupach doświadczalnych przemawia natomiast za efektywną suplementacją *in ovo* związków, które na poziomie komórkowym regulują procesy glukoneogenezy.

Analiza MALDI-TOF MS tkanek jelita grubego wykazała, że w 12 godzinie po wykluciu w grupach doświadczalnych i w kontrolnej dochodzi do ekspresji białka syntetazy gamma-glutamylcysteinowej (Gamma-ECS, gamma-glutamylcysteine synthetase), znanej również jako ligaza glutaminianowo-cysteinowa (glutamate-cysteine ligase) o masie 8171 Da, przy czym najwyższą ekspresję wykazano u ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Białko to jest pierwszym enzymem szlaku biosyntezy komórkowego glutationu (GSH), uczestniczącego w procesach antyoksydacyjnych (Franklin i in., 2009). Ekspresja tego białka u ptaków w badanych grupach potwierdza ochronną rolę podawanego *in ovo* pro-

biotyku wieloszczepowego i Zn w stresie oksydacyjnym, co ma znaczenie dla przeżycia komórek i rozwoju embrionów (Dalton i in., 2004). Analiza wyników uzyskanych w doświadczeniu wykazała ponadto, że w grupie kontrolnej w 12 godzinie po wykluciu w tkankach jelita grubego dochodzi do ekspresji podjednostki białka ATP-azy typu V (V-type proton ATPase subunit) o masie 9002 Da. Ekspresję tego białka wykazaliśmy we wszystkich badanych grupach w 12 godzinie po wykluciu w woreczku żółtkowym, przy czym największą ekspresję stwierdziliśmy w woreczku żółtkowym ptaków z grupy otrzymującej *in ovo* probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly. Białko to pełni liczne funkcje, m.in. uczestniczy w procesach regulacji pH, prowadzi do zakwaszenia przedziałów wewnątrzkomórkowych i odpowiada za transport protonów z cytozolu do przestrzeni pozakomórkowej, a także bierze udział w procesach nowotworzenia i neurodegeneracyjnych (Forgac, 2007; Casey i in., 2010). Ważną funkcją tego białka jest udział w procesach utrzymywania homeostazy składników odżywczych i energii w komórkach (Xu i Ren, 2015), zatem jego ekspresja przemawia za zwiększonym zapotrzebowaniem na składniki odżywcze ze strony rozwijających się komórek organizmu. Należy przyjąć, że suplementowane *in ovo* probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly stymulują w okresie embrionalnym syntezę V-ATPazy, która uczestniczy w procesach anabolicznych warunkujących prawidłowy wzrost i rozwój organizmu.

Analizując różnice w składzie peptydowo-białkowym próbek tkankowych pochodzących od ptaków z grup doświadczalnych i kontrolnej stwierdziliśmy, że są one najmniej widoczne w przypadku woreczków żółtkowych. Wykazane różnice dotyczyły natomiast intensywności pików o masie 9152 Da, odpowiadającemu białku różnicowania naskórka (epidermal differentiation protein (NK2 homeobox 3), o masie 9678 Da, odpowiadającemu białku prolaktoliberyna (prolactin releasing hormone) oraz o masie 8433 Da, odpowiadającemu białku fosfataza serynowo-treoninowa (protein-serine/threonine phosphatase). W doświadczeniu wykazaliśmy, że stężenie tych peptydów wzrasta w przypadku suplementacji *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym z chelatem Zn-Gly oraz samym chelatem Zn-Gly. Z danych piśmiennictwa wynika, że białka te pełnią w organizmie liczne funkcje, m.in. uczestniczą w procesach różnicowania komórkowego, w cyklu komórkowym, regulacji odpowiedzi immunologicznej, procesach metabolicznych, wzrostu, rozwoju i reprodukcji (Mo i in., 2022; Bastan i in., 2014). Wysoka ekspresja peptydów u ptaków z tych grup jednoznacznie świadczy, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly podane *in ovo* stymulują procesy metaboliczne odpowiedzialne za prawidłowy wzrost i rozwój szybko dzielących się komórek utrzymując w ten sposób homeostazę organizmu. Jednocześnie, poprzez uczestniczenie w procesach regulacji odpowiedzi immunologicznej i syntezę specyficznych białek badane suplementy zapewniają ochronę rozwijającym się embrionom i pisklętom w okresie powylęgowym.

Praca IV

5.4. „*Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens*”

Współczesne preferencje konsumentów skierowane są głównie na spożywanie mięsa drobiowego, które uważane jest za jedno z najzdrowszych z uwagi na kompozycję składników odżywczych oraz skład kwasów tłuszczowych (FA), postrzegany jako ważny parametr jakości mięsa. Mięso drobiowe zawiera korzystną dla zdrowia mieszankę kwasów tłuszczowych nienasyconych, wśród których przeważają wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) oraz cechuje się niską zawartością cholesterolu, co wpływa korzystnie na ograniczenie ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego (Connolly i Campbell, 2023). Wśród innych czynników, które wpływają na jakość mięsa drobiowego i zawartość FA należy wyróżnić uwarunkowania genetyczne i sposób żywienia ptaków (Fletcher, 2002). Szczególne znaczenie przypisywane jest dodatkowi żywieniowemu, do których należą m.in. badane w doświadczeniu suplementy Zn i probiotyki. Z danych piśmiennictwa wynika, że istnieje związek pomiędzy suplementacją Zn oraz metabolizmem FA i stężeniem cholesterolu w surowicy (Yary i in., 2016; Stawarska i in., 2021). Analogicznie, jak wykazano w badaniach na świniach, stosowanie probiotyków lub prebiotyków jako suplementów diety wywiera działanie hipocholesterolemiczne i zwiększa zawartość PUFA w mięśniach (Tufarelli i in., 2017; Chang i in., 2018a), lub też nie wpływa na stężenie cholesterolu w surowicy (Salma i in., 2007; Zhou i in., 2010; Ooi i Liong, 2010). Biorąc pod uwagę dane piśmiennictwa przyjęliśmy założenie, że suplementacja *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly powinna wpłynąć na procesy metaboliczne, w tym profil kwasów tłuszczowych, głównie PUFA, w mięśniach i narządach drobiu. Celem badań przedstawionych w pracy „*Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens.*” była ocena profilu lipidowego, profilu kwasów tłuszczowych oraz stężenia MDA w surowicy i tkankach kurcząt, którym suplementowano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i/lub chelat Zn-Gly.

5.4.1. Analiza profilu lipidowego oraz profilu kwasów tłuszczowych u kurcząt

Analiza wyników badań wskazuje, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly podawane *in ovo* obniżają stężenie PUFA w dniu wylęgu (DOH) w mięśniach piersiowym, udowym i w tkance jelit. W wątrobie natomiast w analogicznym terminie badania wykazano wzrost stężenia PUFA pod wpływem suplementacji Zn w postaci chelatu i w połączeniu z probiotykiem wieloszczepowym. Badania wykonane w 7 dniu życia kurcząt wykazały, że stężenie PUFA w mięśniach udowym, wątrobie i tkance jelita cienkiego było statystycznie istotnie wyższe w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* jednocześnie probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Analogiczną zależność wykazano w mięśniach piersiowych w grupie ptaków otrzymujących jedynie chelat Zn-Gly. Można zatem przyjąć, że Zn podawany *in ovo* wpływa na procesy metaboliczne i stymuluje syntezę PUFA, co prowadzi do zwiększenia ich stężenia w tkankach u drobiu w okresie powylęgowym. Wykazano także, że w przypadku probiotyków efekt stymulacyjny jest uzależniony od rodzaju mięśni. Przykładowo, w mięśniach piersiowych wykazano spadek stężenia PUFA w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy, natomiast w mięśniach udowych w tej samej grupie ptaków stwierdzono wzrost stężenia PUFA. Podobne spostrzeżenia poczynili Hossain i in. (2012), którzy wykazali obniżenie stężenia PUFA w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów karmionych dietą wzbogaconą ekstraktem ziołowym (*Alisma canaliculatum*) w połączeniu z różnymi szczepami mikroorganizmów probiotycznych. Odmiennie wyniki uzyskali Salma i in. (2007), którzy wykazali wzrost stężenia PUFA u kurcząt żywionych przez 6 tygodni paszą zawierającą 0,04% *Rhodobacter capsulatus*. Zhou i in. (2009) i Ghasemi i in. (2016) nie potwierdzili natomiast stymulującego efektu suplementacji paszy prebiotykami i synbiotykami w odniesieniu do stężenia PUFA w mięśniach piersiowych 42-dniowych kurcząt. Te sprzeczne wyniki mogą być z jednej strony związane z różnymi rodzajami drobnoustrojów wykorzystywanych w konstrukcji pro- pre- i synbiotyków, a z drugiej z odmiennymi szlakami metabolicznymi lipidów oraz rodzajem syntetyzowanych kwasów tłuszczowych.

Składniki chemiczne mięśni drobiu, w tym kwasy tłuszczowe, takie jak MUFA, PUFA i SFA, wykorzystywane są w ocenie jakości i wartości odżywczej mięsa oraz decydują o jego cechach sensorycznych, takich jak smak i zapach (Wood i in., 2004). Wykazano, że w mięsie drobiowym występują głównie kwasy tłuszczowe, takie jak palmitynowy C16:0, stearynowy C18:0, oleinowy C18:1n9c i należący do PUFA kwas linolowy C18:2n6c (Amorim i in., 2016). Kwasy PUFA są wrażliwe na peroksydację, w wyniku której powstają lotne i nielotne związki decydujące o zapachu i smaku mięsa. Wysokie stężenie C18:2n6c oraz procesy peroksydacji

tego kwasu są głównie odpowiedzialne za negatywne doznania sensoryczne (Lee i in., 2019). Analiza wyników badań wskazuje, że podanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly nie wywołuje u piskląt w dniu wylęgu zmian stężenia kwasu linolowego w mięśniu piersiowym, natomiast wpływa na obniżenie stężenia tego kwasu w mięśniu udowym. Podobne spostrzeżenia poczynili Tang i in. (2021), którzy wykazali, że suplementacja diety drobiu *B. subtilis* nie wywiera wpływu na stężenie C18:2n6c w mięśniach piersiowych i udowych, dzięki czemu stosowanie probiotyku nie wpływa na smak mięsa. Badanie wykonane w 7 dniu życia kurcząt wykazało wyższe stężenie tego kwasu w mięśniu udowym we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu do kontroli. W mięśniu piersiowym wyższe stężenie C18:2n6c stwierdzono jedynie w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly. Można zatem przyjąć, że wraz z rozwojem organizmu drobiu dochodzi do modyfikacji szlaków metabolicznych tłuszczów, przypuszczalnie w wyniku ich aktywowania przez suplementy podawane *in ovo*, zwłaszcza chelat glicynowy Zn, co prowadzi do zwiększenia syntezy PUFA, w tym kwasu linolowego i negatywnie oddziałuje na smak mięsa. Ponadto, mięso drobiowe, a zwłaszcza mięsień udowy, ze względu na wyższą zawartość PUFA jest bardziej podatne na procesy peroksydacyjne, co ogranicza możliwości dłuższego przechowywania.

W analizie zawartości FA w tkankach drobiu należy uwzględnić fakt, że tłuszcz drobiowy charakteryzuje się wysokim stężeniem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), w szczególności n-3 PUFA (Valsta i in., 2005; D'Alessandro i in., 2012), które wywierają korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy, immunologiczny, procesy metaboliczne i narząd wzroku, a nawet wspomagają potencjał zdrowia psychicznego konsumenta. Zatem wyższa zawartość tych kwasów w mięsie jest zjawiskiem pożądanym z punktu widzenia zdrowotności organizmu. W naszym doświadczeniu w dniu wylęgu i w 7 dniu życia ptaków nie stwierdziliśmy zmian w stężeniu Σ PUFA n-3 w wątrobie i tkance jelit cienkich. W mięśniu piersiowym wzrost stężenia Σ PUFA n-3 wykazaliśmy jedynie w badaniu wykonanym w 7 dniu w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* chelat Zn-Gly z dodatkiem lub bez dodatku probiotyku wieloszczepowego. W mięśniu udowym natomiast we wszystkich grupach doświadczalnych wykazaliśmy w dniu wylęgu spadek stężenia Σ PUFA n-3 w porównaniu do kontroli, a w 7 dniu życia przeciwnie, wykazaliśmy wzrost stężenia Σ PUFA n-3. Wysokie stężenia Σ PUFA n-3 mogą być stwierdzane w przypadku niedoborów cynku, zatem wykazane w doświadczeniu niskie stężenie Σ PUFA n-3 w dniu wylęgu potwierdza skuteczność i zasadność suplementacji Zn. Widoczny od 7 dnia doświadczenia wzrost stężenia Σ PUFA n-3 nie świadczy o niedoborach mineralnych, a raczej wskazuje na związek między PUFA n-3 i mikroflorą jelitową oraz

suplementowanymi minerałami. Zmodyfikowana pod wpływem podawanego *in ovo* probiotyku wieloszczepowego mikroflora przewodu pokarmowego drobiu może wpływać na metabolizm i wchłanianie n-3 PUFA, co prowadzi do widocznego w doświadczeniu wzrostu stężenia tego kwasu w tkance mięśniowej. Także same n-3 PUFA pobierane przez ptaki w standardowej mieszance paszowej mogą zmieniać liczebność i różnorodność mikrobiomu jelitowego oraz wpływać na tempo przemian metabolicznych, w tym aktywność desaturaz w szlaku metabolizmu kwasu PUFA n-3 i n-6. Wzajemne oddziaływanie między PUFA n-3, mikroflorą jelitową (Jayapala i Lim, 2023) i Zn, który wpływa na funkcje odpornościowe pomaga w utrzymaniu integralności jelit i homeostazy środowiska mikrobiologicznego przewodu pokarmowego.

Warto pamiętać, że wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), w szczególności kwas linolowy i linolenowy, obniżają stężenie frakcji cholesterolu, LDL i HDL (Zuliani i in., 2009). Należało zatem oczekiwać, że wykazane w badaniach niskie stężenia PUFA w tkankach i narządach ptaków w grupach doświadczalnych nie będą miały związku ze stężeniem cholesterolu LDL i HDL. Jednakże, wyniki oznaczeń HDL w dniu wylęgu wskazują, że podawane *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly nie wywołują zmian w stężeniu tej frakcji, a w grupie otrzymującej probiotyk wieloszczepowy wykazaliśmy nawet spadek jej stężenia. Badanie stężenia HDL wykonane w 7 dniu życia ptaków wykazało natomiast statystycznie istotny wzrost stężenia tej frakcji w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Odmiennie kształtowało się stężenie LDL, które w dniu wylęgu było wyższe we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu do kontroli, a w 7 dniu badania było niższe we wszystkich grupach doświadczalnych. Wykazane w badaniach niskie stężenia HDL mogą być związane z niskim stężeniem kwasów linolowego i linolenowego w badanych tkankach. Mogą one także się wiązać ze stężeniem kwasu mirystynowego ($C_{14}H_{28}O_2$), należącego do SFA. Kwas mirystynowy może bowiem wpływać na obniżenie stężenia HDL, ponieważ modyfikuje niespecyficzne wiązanie frakcji HDL do komórek wątroby, co potwierdzili Noto i in. (2016), w badaniach komórek wątroby na modelu *in vitro*. W naszych badaniach wyższe stężenie kwasu mirystynowego w grupach doświadczalnych w porównaniu do kontroli stwierdzono jedynie w mięśni piersiowym w 7 dniu badania. W pozostałych tkankach i terminach badań stężenie tego kwasu w badanych grupach nie ulegało zmianie lub ulegało nieznacznemu obniżeniu w porównaniu do grupy kontrolnej. Przedstawione dane dowodzą, że podawane *in ovo* preparaty, jakkolwiek nie wpływają istotnie na stężenie PUFA w pierwszym okresie po wylęgu, nie wywołują także wzrostu stężenia niektórych nasyconych kwasów tłuszczowych, co przeciwdziała zmniejszaniu stężenia tzw. dobrego cholesterolu HDL.

Grupą kwasów tłuszczowych ważną dla diety człowieka są nasycone kwasy tłuszczowe (SFA – saturated fatty acids), do których zaliczany jest m.in. kwas laurynowy (C12), kwas palmitynowy (C16) i stearynowy (C18) (Shramko i in., 2020). Korzystne oddziaływanie tych kwasów na organizm przejawia się dostarczaniem energii, udziałem w budowie błon komórkowych i przyspieszaniem wchłaniania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (Shen i in., 2025). Nadmierne ich spożycie wiąże się natomiast z negatywnym wpływem na gospodarkę lipidową, zwiększeniem stężenia LDL i działaniem prozakrzepowym, co prowadzi do rozwoju choroby niedokrwiennej serca (CAD, coronary artery disease) (Zong i in., 2016). Głównymi SFA występującymi w mięsie drobiowym są kwas palmitynowy i stearynowy (Amorim i in., 2016), a wysokie stężenie tych kwasów w tkankach może być niekorzystne z punktu widzenia prozdrowotnej jakości mięsa. W badaniach wykazano, że suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym powodowała w dniu wylęgu statystycznie istotny wzrost stężenia SFA w mięśni piersiowym i wątrobie, natomiast w tkance jelita cienkiego analogiczny wzrost stwierdzono po podaniu samego chelatu Zn-Gly lub w połączeniu z probiotykiem wieloszczepowym. W 7 dniu życia piskląt zwiększenie stężenia SFA, w tym głównie kwasu stearynowego i palmitynowego, wykazano w mięśni piersiowym i wątrobie w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Ponadto, w doświadczeniu wykazaliśmy wzrost stężenia kwasu mirystynowego w mięśni piersiowym, szczególnie widoczny w 7 dniu po wylęgu w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Zastosowany *in ovo* probiotyk wieloszczepowy zwiększał całkowite SFA w mięśni piersiowym rozwijającym się intensywnie u drobiu, w odróżnieniu od mięśnia udowego, w którym stężenie SFA nie ulegało zmianie lub było niższe w porównaniu do grupy kontrolnej, co także wskazuje na korzystny wpływ na zdrowie konsumenta. Warto tutaj przytoczyć wyniki badań Goluch i in. (2023), którzy stosując w okresie tuczu trzody chlewnej probiotyk EM Bokashi o podobnym składzie do preparatu stosowanego w naszym doświadczeniu nie wykazali istotnych różnic w stężeniu SFA między grupą doświadczalną i kontrolną. Podobnie, Haščík i in. (2014) wykazali, że stosowanie u brojlerów pyłku pszczelego i probiotyku jako dodatków paszowych obniża stężenie nasyconych kwasów tłuszczowych w mięsie, takich jak mirystynowy, palmitynowy, i stearynowy. Zjawisko to uwarunkowane jest przypuszczalnie ogólnym zmniejszeniem stężenia lipidów w osoczu, lub zmniejszeniem stężenia mRNA desaturazy stearoilokoenzymu A w wątrobie (SCD-1, $\Delta 9$ -desaturaza), katalizującej przemianę nasyconych kwasów tłuszczowych (Kucharski i Kaczor, 2014; Jung i in., 2006). Wykazane w badaniach zmiany stężenia SFA mogą być związane z odmiennym składem probiotyku wieloszczepowego, a także okresem rozwoju zarodka, w którym dokonywano suplementacji *in ovo*.

Korzystny z punktu widzenia zdrowia człowieka stosunek Σ PUFA do Σ SFA w tkance mięśniowej powinien być większy niż 0,45, ponieważ niższe wartości tego wskaźnika prowadzą z reguły do hipercholesterolemii, jako konsekwencji spożywania mięsa (Mapiye i in., 2011). Po podaniu *in ovo* badanych preparatów stosunek Σ PUFA/ Σ SFA w mięśniach piersiowych w dniu wylęgu we wszystkich badanych grupach nie różnił się znacząco w porównaniu do kontroli i kształtował się w granicach od 0,46 do 0,56. W przypadku mięśnia udowego stosunek ten był niższy w grupach doświadczalnych (0,53 – 0,67) w porównaniu do grupy kontrolnej – 0,81. W 7 dniu życia kurcząt w mięśniach piersiowych stosunek ten wynosił poniżej 0,45 i było to widoczne zwłaszcza w grupach ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy, w których osiągał on wartość 0,3 – 0,41. Odwrotną zależność stwierdzono w analogicznym okresie badania w mięśniach udowych, w których stosunek ten był wyższy w grupach doświadczalnych w porównaniu do kontroli. Można zatem wnioskować, że mięsień udowy drobiu cechuje się wyższym potencjałem antycholesterolemicznym w porównaniu do mięśnia piersiowego i może być polecany w żywieniu osób narażonych na choroby tłuszczowe. W odniesieniu do wątroby, mimo stwierdzonego w pierwszym okresie badania wyższego stosunku Σ PUFA do Σ SFA, w 7 dniu doświadczenia dochodziło do spadku wskaźnika w grupach doświadczalnych, co w przypadku dłuższego okresu spożywania takich podrobów niesie ryzyko zwiększenia stężenia cholesterolu i związanych z tym chorób układu sercowo-naczyniowego.

Stosunek P/S, n-6/n-3 PUFA, h/H i inne aterogenne wskaźniki trombogenności są szeroko stosowane do oceny wartości odżywczej tłuszczu zawartego w tkankach (Dal Bosco i in., 2024). Z punktu widzenia zdrowia człowieka ważny jest stosunek P/S, ponieważ rzutuje on na występowanie chorób układu krążenia (Wood i in., 2004). Zaleca się, aby stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych PUFA do SFA (P/S) w tkankach osiągał wartość min. 0,4 (Muchenje i in., 2009). Wykazano, że spożywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych zmniejsza ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, niektórych nowotworów oraz astmy i cukrzycy (Milićević i in., 2014). W naszym doświadczeniu zastosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly skutkowało stwierdzonym w dniu wylęgu i w 7 dniu po wylęgu zwiększeniem stosunku P/S w mięśniach piersiowych. W mięśniach udowych zwiększenie proporcji widoczne było tylko w dniu wylęgu, natomiast w 7 dniu po wylęgu stosunek ten był niższy w grupach doświadczalnych w porównaniu do kontrolnej, co wiązało się bezpośrednio ze spadkiem stężenia PUFA. Stosunek P/S w wątrobie, badany w dniu wylęgu, wzrastał jedynie w grupie, w której podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy, natomiast w 7 dniu po wylęgu wzrost tego parametru stwierdzono w grupie ptaków otrzymujących sam probiotyk wieloszcze-

powy oraz probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Korzystny stosunek P/S, wynoszący powyżej 0,4 w mięśni piersiowym pozwala na stwierdzenie, że zastosowana suplementacja *in ovo* sprzyja nie tylko kształtowaniu się właściwej proporcji kwasów PUFA do SFA, ale także promuje prozdrowotne właściwości mięsa drobiowego.

W kontekście oceny zdrowotności mięsa dla człowieka wskazane jest także aby pozyskiwane mięso, np. z drobiu, cechowało się niskimi wskaźnikami AI, wynoszącymi poniżej 1,0 i TI, poniżej 0,5 oraz wysokim wskaźnikiem h/H (Fernandes i in., 2014). Wskaźnik AI obrazuje zależność pomiędzy sumą głównych SFA i głównych klas nienasyconych kwasów tłuszczowych (NKT). Wykazano, że SFA działają proaterogennie sprzyjając adhezji lipidów do komórek naczyń krwionośnych, natomiast NKT wykazują działanie przeciwmiażdżycowe (Wołoszyn i in., 2020). Wskaźnik TI dotyczy zależności pomiędzy protrombogenicznymi (nasyconymi) i antytrombogenicznymi kwasami tłuszczowymi (Frunză i in., 2025). Wysokie wartości wskaźników AI i TI w mięsie mogą, w przypadku jego spożywania, pobudzać agregację płytek krwi i sprzyjać tworzeniu się zakrzepów w naczyniach, w wyniku czego dochodzi do rozwoju choroby wieńcowej (Ghaeni i in., 2013). Korzystne dla zdrowia człowieka są natomiast niskie wartości AI i TI w mięsie, które przeciwdziałają miażdżycy naczyń i zapewniają ochronę przed chorobą wieńcową. W naszym doświadczeniu w dniu wylęgu nie wykazano zmian w TI w mięśni piersiowym, natomiast w mięśni udowym wartość tego wskaźnika była wyższa w grupach ptaków otrzymujących *in ovo* chelat Zn-Gly. Wartość AI w analogicznym okresie badania była, podobnie jak w przypadku TI, wyższa w mięśni udowym w grupach ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly z/bez probiotyku wieloszczepowego oraz w mięśni piersiowym, w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly. Badanie wykonane w 7 dniu doświadczenia wykazało wartości AI i TI wyższe w mięśni piersiowym w grupach ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy. W przypadku mięśnia udowego wartości badanych parametrów w tym terminie badania były statystycznie istotnie niższe w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Warto zaznaczyć, że w obu terminach badań wartość AI wynosiła poniżej 1,0, natomiast wskaźnik TI był wyższy niż 0,5 i wynosił w grupach doświadczalnych od 0,88 do 1,83, czyli był kilkakrotnie wyższy od wartości zalecanych dla tych grup mięśni. Mimo нефизjologicznych wartości wskaźnika TI, co mogłyby sugerować, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly działają prozakrzepowo mogąc przyczyniać się do rozwoju chorób układu krążenia, należy podkreślić, że także w grupie kontrolnej wskaźnik ten przekraczał 0,5, osiągając nawet wartość 1,27 w mięśni udowym w 7 dniu badania. Uzyskane wyniki mogłyby sugerować, że mięso pochodzące od kurcząt żywionych z wykorzystaniem badanych suplementów diety może mieć gorsze walory dietetyczne. Wyniki badań Winiarska-Mieczan i in.

(2023), dowodzą jednak, że ocenę wartości dietetycznej mięsa należy traktować kompleksowo, zatem jeden odbiegający od normy parametr nie powinien wpływać na ocenę ogólną. W przypadku wątroby w dniu wylęgu statystycznie istotnie niższe wartości wskaźnika TI uzyskano w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly, natomiast w 7 dniu badania wyższe wartości TI i AI uzyskano w tym narzędzie w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy. W tkance jelit wartości AI i TI były wyższe w dniu wylęgu w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly, natomiast w 7 dniu wartości AI i TI były statystycznie istotnie niższe w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* chelat Zn-Gly jak i probiotyk wieloszczepowy. Analizując przedstawione dane należy założyć, że mimo wysokich początkowych wartości obydwu wskaźników będą one miały tendencję do obniżania się wraz z wiekiem. Z opublikowanych wcześniej badań Winiarskiej-Mieczan i in. (2021) wynika, że po zastosowaniu chelatu Zn w paszy dla drobiu w dawce 50 mg/kg mieszanki paszowej wskaźniki AI i TI są bardzo niskie i odpowiadają wartościom zalecanym dla mięsa drobiowego, natomiast wskaźnik h/H pozostaje wysoki. Badania te dowiodły, że chelat glicynowy Zn może być stosowany w ilości pokrywającej 50% zapotrzebowania na Zn, a mimo to zapewni wysoką wartość dietetyczną mięsa i wysoką stabilność antyoksydacyjną. Cytowane badania przeprowadzano jednak w okresie od wyklucia do uboju i nie obejmowały one okresu rozwoju zarodkowego, w którym dochodzi do intensywnych przemian tłuszczowych. Niewątpliwie, podawane *in ovo* suplementy diety stosowane w naszym doświadczeniu silnie oddziałują na metabolizm tłuszczów, co przekłada się na zmienne wartości badanych wskaźników w mięśniach, a pośrednio na indeks aterogeny (AI), indeks trombogeny (TI) i stosunek kwasów tłuszczowych hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych (h/H). Ponieważ nasze badania były prowadzone w początkowym okresie rozwoju drobiu, nie powinien dziwić fakt, że analogiczne wyniki mogą się różnić w końcowym okresie odchowu piskląt.

Określanie wskaźnika nasycenia – S/P stanowi powszechnie wykorzystywane kryterium oceny wartości dietetycznej tłuszczu tkankowego (Harding i in., 2004). Na wartość tego wskaźnika wpływa głównie obecność kwasów PUFA i MUFA. Im niższy jest wskaźnik nasycenia tym wyższa jest jakość prozdrowotna mięsa. Wykazana w doświadczeniu niższa wartość wskaźnika S/P w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* chelat Zn-Gly i chelat Zn-Gly z probiotykiem wieloszczepowym, świadczy o większej wartości zdrowotnej tkanek pozyskiwanych od takiego drobiu. W przeciwieństwie do wskaźnika S/P wartość stosunku h/H powinna być jak najwyższa (Winiarska-Mieczan i in., 2023), ponieważ określa on wpływ kwasów tłuszczowych na metabolizm cholesterolu, ważnego parametru oceny zdrowia człowieka. Podanie *in ovo* badanych suplementów nie wpływało na wartość h/H w dniu wylęgu lub też obniżało tę wartość

w tkance mięśnia piersiowego i udowego ptaków w grupach doświadczalnych. Jedynie w 7 dniu badania odnotowano wysokie wartości h/H w mięśniu udowym w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* chelat Zn-Gly. Warto podkreślić, że w dniu wylęgu w surowicy ptaków ze wszystkich grup doświadczalnych wykazaliśmy wyższe wartości stężenia cholesterolu w porównaniu do kontroli, natomiast w 7 dniu badania stężenie cholesterolu było wyższe jedynie w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Można zatem domniemywać, że suplementacja *in ovo* nie wpływa znacząco na procesy metabolizmu cholesterolu i nie obniża jego całkowitej zawartości. Analogicznie, stosowanie wieloszczepowego probiotyku EM Bokashi u innych gatunków zwierząt, m.in. świń w okresie tuczu, nie wpływało na zmiany wskaźnika h/H (Goluch i in., 2023). Z danych piśmiennictwa wynika natomiast, że suplementacja probiotykami, np. *L. acidophilus* u brojlerów w okresie od wylęgu do uboju poprawia wskaźniki zdrowotne mięsa, w tym stosunek PUFA/SFA, MUFA/SFA, UFA/SFA, wskaźnik nasycenia, AI, TI, destylowanych kwasów tłuszczowych (DFA), kwasów tłuszczowych hipercholesterolemicznych (HFA) i h/H. Oddziaływanie takie jest przypuszczalnie związane z wpływem probiotyku na ekspresję genu $\Delta 9$ -desaturazy stearoilo-CoA (SCD-1) (Dev i in., 2021). Odmienne wyniki badań uzyskane w naszym doświadczeniu są efektem suplementacji *in ovo* dokonywanej przed okresem wylęgu, zatem przypuszczalnie wpływ badanych suplementów na gospodarkę tłuszczową wykorzystywał odmienne szlaki metaboliczne niż opisywane w przypadku stosowania suplementów w okresie przyżyciowym.

Analizując uzyskane wyniki badań warto także zwrócić uwagę na krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), do których należy m.in. kwas masłowy ($C_4H_8O_2$). Są to związki organiczne, stanowiące ważne źródło energii dla komórek nabłonkowych (Czachajda i in., 2024). Zapewniają one prawidłowe funkcjonowanie przewodu pokarmowego, obniżają pH jelit, zapobiegają wzrostowi patogenów, zwiększają wchłanianie minerałów, a ponadto mogą hamować działanie cytokin prozapalnych (Czachajda i in., 2024). Wykazano, że kwas masłowy wpływa na utrzymywanie homeostazy glukozy we krwi i stymuluje metabolizm glikogenu, wpływając na pracę i wydajność mięśni (Zhang i in., 2019). Z badań Ahmed i in. (2018) wynika, że suplementacja paszy prebiotykami promuje wzrost bakterii z grupy LAB, co wpływa na zwiększenie stężenia SCFA w organizmie. Badanie w dniu wylęgu wykazało, że stężenie kwasu masłowego było statystycznie istotnie wyższe w tkance jelita cienkiego w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly. Analogiczną zależność wykazano w przypadku wątroby ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. W 7 dniu życia ptaków stężenie tego kwasu było wyższe w tkance mięśnia udowego i jelita cienkiego w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy. Należy przypuszczać, że zastosowanie *in ovo* badanych

preparatów oddziałują na organizm na etapie wzrostu ptaków stymulując ich rozwój poprzez stabilizację mikroflory przewodu pokarmowego i syntezę SCFA przez drobnoustroje tworzące mikrobiom. Aktualnie duże znaczenie przypisywane jest wzajemnemu oddziaływaniu mikrobiomu jelit i tkanki mięśniowej (Di Vincenzo i in., 2024). Oddziaływanie to określane jest mianem osi jelito-mikroorganizm-mięśnie, w której sygnały komórkowe są przekazywane za pośrednictwem jelitowych SCFA, wytwarzanych przez bakterie mikrobiomu. W tym przypadku SCFA mogą oddziaływać także na metabolizm mięśni i ich funkcjonowanie (Canfora i in., 2019; Li i in., 2018). W badaniach stwierdzono wyższe stężenie kwasu masłowego w tkance mięśnia piersiowego w dniu wylęgu i w 7 dniu życia piskląt, którym suplementowano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Najwyższe stężenie tego kwasu wykazano natomiast w grupie piskląt, którym podawano *in ovo* jedynie probiotyk wieloszczepowy. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia, zgodnie z którymi bakterie probiotyczne oddziałują na mikrobiom jelitowy rozwijającego się zarodka, a później pisklęcia. Efektem tych interakcji jest modyfikacja składu mikrobiomu, sprzyjająca produkcji SCFA. Obecny m.in. w mięśniach piersiowych kwas masłowy, dostarczany tam drogą krwi, wpływa na wzrost mięśni, rozwój i funkcjonowanie. Podobne zależności wykazali Chang i in. (2018) w badaniach na myszach. Wynika z nich, że suplementacja maślanu stymuluje produkcję włókien oksydacyjnych w mięśniach szkieletowych oraz zwiększa zawartość mioglobiny i troponiny w mięśniach wpływając na ich kurczliwość. Należy przypuszczać, że zawarte w probiotyku wieloszczepowym bakterie, w tym z grupy LAB, stymulują syntezę SCFA, w tym kwasu masłowego, co przekłada się na jego wysokie stężenie w mięśniach piersiowych i wpływa w późniejszym okresie rozwoju kurcząt na wartość technologiczną i jakość konsumpcyjną mięsa drobiowego.

5.4.2. Analiza stężenia MDA w tkankach kurcząt

Tkanki rozwijających się zarodków kurzych cechują się wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji lipidowej (Surai i in., 2016). Intensywne procesy metaboliczne, zachodzące u szybko rozwijających się zarodków kur i w okresie powylęgowym prowadzą do rozwoju stresu oksydacyjnego i wytwarzania ROS. Efektem działania ROS są procesy peroksydacji lipidów, prowadzące do zmiany składu, struktury i właściwości błon komórkowych oraz aktywności enzymów związanych z błoną (Surai, 2002, Surai, 2006). W konsekwencji może to prowadzić do zwiększenia zamieralności zarodków i upośledzenia wzrostu ptaków w okresie powylęgowym, a także negatywnie wpływać na zjawiska odpornościowe u ptaków. Aby zapobiegać tego typu uszkodzeniom zarodki kurze wyposażone są w ochronę an-

tyoksydacyjną (Surai i in., 2016). Nasze badania wykazały, że podawanie *in ovo* wieloszczepowego probiotyku i chelatu Zn-Gly zwiększa całkowitą zdolność antyoksydacyjną (T-AOC) oraz aktywność SOD i CAT, przy jednoczesnym uwalnianiu cytokin pro- i przeciwzapalnych, tj. TNF- α , IFN- γ i IL-10. Wyniki te są dowodem stymulującego działania tych preparatów na komórkowe i humoralne mechanizmy odpornościowe. Wywoływane pod wpływem badanych preparatów zmiany ilościowe i jakościowe w kwasach tłuszczowych tkanek i narządów sprzyjają procesom utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, podczas których powstaje dialdehyd malonowy (MDA), będący wskaźnikiem intensywności procesów utleniania (Del Rio i in., 2005).

Analiza stężenia MDA wykazała w dniu wylęgu wzrost badanego parametru w tkance mięśnia piersiowego w grupie III i IV ptaków, które otrzymywały *in ovo* odpowiednio probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly i sam chelat Zn-Gly oraz w wątrobie w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Warto podkreślić, że w żadnej z tkanek nie wykazano w tym terminie wzrostu stężenia PUFA podatnych na peroksydację. Opublikowane dotychczas wyniki badań wskazują, że probiotyki wywierają działanie ochronne na organizm w przypadku stresu oksydacyjnego (Kullisaar i in., 2002). Wykazany w badanych tkankach, zwłaszcza w mięśniowej, wzrost stężenia MDA może być związany ze wzrostem i rozwojem zarodków oraz ogólnym rozwojem mięśni u brojlerów pod wpływem probiotyku. Procesy te związane są z ekspresją genów regulujących proliferację i różnicowanie komórek progenitorowych mięśni oraz wzrostem ilości włókien mięśniowych (Muyyarikkandy i in., 2023), i rearanżacją tkanek, w wyniku której dochodzi do utleniania w obrębie błon komórkowych. Wzrost stężenia MDA w woreczku żółtkowym w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly jest przypuszczalnie spowodowany aktywacją metaboliczną zachodzącą pod wpływem suplementacji tymi preparatami i intensywnym w tym okresie rozwojem struktur komórkowych. W 7 dniu badania nie stwierdzono natomiast zmian w stężeniu MDA w tkance jelita cienkiego i w wątrobie. Ponadto, stężenie MDA w tkance mięśnia piersiowego było niższe w 7 dniu w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i/lub chelat Zn-Gly, a w surowicy i tkance mięśnia udowego było nieznacznie wyższe w grupie ptaków otrzymujących chelat Zn-Gly. W tym samym okresie wykazaliśmy także wzrost stężenia podatnych na peroksydację PUFA, m.in. w tkance mięśnia piersiowego (grupa IV), jelita cienkiego (grupa III) i mięśnia udowego (grupa II i III) ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i/lub chelat Zn-Gly. Niskie stężenie MDA sugeruje zatem, że badane preparaty powodują ograniczenie stresu oksydacyjnego zarodka i nowo

wyklutego pisklęcia i nie generują nadmiernej produkcji ROS. Warto podkreślić, że niższe stężenie MDA w surowicy i tkankach, porównywalne z grupą kontrolną, uzyskano w badaniach w 18 dniu inkubacji, tj. 24 godziny po podaniu *in ovo* chelatu Zn-Gly oraz w tej samej grupie ptaków w dniu wylęgu. Nasze wyniki są zgodne z uzyskanymi przez Xiao i in. (2024) którzy wykazali, że podawany *in ovo* Zn-Gly z/lub bez stymulacji lipopolisacharydem nie powoduje zmian stężenia MDA w wątrobie i tkance jelita cienkiego. Prawdopodobnie cynk podawany *in ovo* nie uczestniczy bezpośrednio w obronie antyoksydacyjnej zarodka, ale pośrednio bierze udział w regulacji homeostazy cynku i hamowaniu wytwarzania cytokin prozapalnych chroniąc przed wystąpieniem tzw. burzy cytokinowej (Nakamura i in., 2019).

Praca V

5.5. „*Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks.*”

W nowoczesnych systemach produkcji drobiu, obejmujących inkubację jaj, klucie oraz wzrost i rozwój piskląt ptaki narażone są na działanie różnorodnych czynników zewnętrznych i wewnętrznych, prowadzących do zaburzeń homeostazy i rozwoju stanu zapalnego (Oke i in., 2024). Dochodzi wówczas do pobudzenia komórek immunokompetentnych, monocytów, makrofagów i limfocytów T do produkcji cytokin i chemokin, m.in. IL1, TNF α i IL6, aktywujących odpowiedź ostrej fazy (APR) (Gruys i in., 2005; Liu i in., 2005). Syntetyzowane w wątrobie białko ostrej fazy (APP) pełni w organizmie różne funkcje, w tym oddziałują na komórki gospodarza przywracając homeostazę (Kurash i in., 2004). Szczególną rolę APP odgrywają w interakcji z mikrobiotą przewodu pokarmowego. Bakterie mikrobioty jelitowej wchodzi w interakcję z tkanką limfoidalną związaną z jelitami, wpływając na rozwój układu immunologicznego, reakcje komórek immunokompetentnych na czynniki szkodliwe oraz tolerancję immunologiczną i homeostazę (Wu i Wu, 2012; Belkaid i Hand, 2014). Wczesna kolonizacja przewodu pokarmowego drobiu poprzez suplementację *in ovo* probiotykami przyczynia się do stymulowania procesów trawienia, wchłaniania i metabolizmu składników odżywczych, dzięki czemu zapobiega zaburzeniom jelitowym wywołanym przez bakterie patogenne oraz wpływa na rozwój układu immunologicznego, wzrost i wydajność produkcyjną kurcząt (Pan i Yu, 2014; Rubio, 2019). Analogicznie, dostarczanie w technologii *in ovo* preparatów mineralnych, w tym Zn w formie organicznej, pobudza rozwój układu odpornościowego zarodka brojlerów, stymulując odpowiedź immunologiczną kurcząt po wykluciu i zwiększając odporność na choroby (Hidayat i in. 2020). Dotychczas nie wyjaśniono jaką rolę w procesach odpornościowych w pierwszych dniach życia kurcząt, w odniesieniu do stymulacji syntezy związków biogennych, pełnią suplementowane *in ovo* probiotyki wieloszczepowe i chelat Zn-Gly. Stało się to przesłanką do podjęcia badań, których celem było określenie wpływu skojarzonej suplementacji *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym zawierającym EM i chelatem Zn-Gly na stężenie cytokin pro- i przeciwzapalnych, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , białek ostrej fazy, ceruloplazminy (CP), α -1-kwaśnej glikoproteiny (α 1AGp), haptoglobiny (Hp), surowiczego składnika amyloidu A (SAA), lektyny wiążącej mannozę (MBL) oraz immunoglobulin, IgY, IgA, IgM, w krwi obwodowej i tkankach kurcząt brojlerów w dniu wylęgu i w 7 dniu życia.

Jednocześnie, w tych samych terminach określono masę narządów limfatycznych, śledziony, grasicy i torby Fabrycjusza będących wskaźnikami rozplemu komórek immunokompetentnych. Dokonano także oceny wpływu badanych preparatów na parametry produkcyjne kurcząt w całym okresie odchowu.

5.5.1. Ocena stężenia białek ostrej fazy w surowicy i tkankach kurcząt

Zmiana składu mikrobioty przewodu pokarmowego poprzez suplementację *in ovo* probiotykami ogranicza namnażanie bakterii chorobotwórczych, np. *E. coli* i *Salmonella* spp. Jak wykazały badania Teague i in. (2017), podanie w 18 dniu inkubacji do jamy owodniowej probiotyku zawierającego mieszaninę bakterii kwasu mlekowego zwiększało liczebność tych bakterii w przewodzie pokarmowym kurcząt po wykluciu. Podobnie, Abdel-Moneim i in. (2020) wykazali, że podanie do woreczka żółtkowego w 17 dniu inkubacji mieszaniny bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum*, *B. infantis*) zwiększało liczebność bakterii kwasu mlekowego i zmniejszało liczbę bakterii *E. coli* w jelicie. Taka modulacja składu mikrobioty jelitowej generuje zmiany w syntezie białek ostrej fazy (APP), które oddziałują z mikrobiotą przewodu pokarmowego. W naszej pracy przyjęliśmy podobną hipotezę, zgodnie z którą zastosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i/lub chelatu Zn-Gly powinno wpłynąć na syntezę białek ostrej fazy w wątrobie i/lub innych narządach.

Jednym z głównych białek ostrej fazy u drobiu jest SAA, wykorzystywany jako biomarker stanu zapalnego (Caliendo i in., 2013; Rhim i in., 2024). Główną funkcją SAA jest oddziaływanie na procesy transportu i metabolizmu lipidów, niezbędne do regeneracji i naprawy błon komórek uszkodzonych w procesach zapalnych, aktywacja komórek układu immunologicznego i ochrona komórek przed stresem oksydacyjnym (Gursky, 2020). Podwyższone stężenie SAA w surowicy ptaków wiąże się najczęściej z toczącym się procesem zapalnym, wywołanym czynnikami zakaźnymi (Nazifi i in., 2011; Asasi i in. 2013), w którym SAA uczestniczy w chemotaktycznej rekrutacji komórek zapalnych do miejsca zakażenia. Ważną rolę w utrzymaniu homeostazy odgrywa także immunomodulacyjne oddziaływanie SAA, prowadzące do ograniczenia procesu zapalnego (Gatt i in., 1998; Urieli-Shoval i in., 2000). Urieli-Shoval i in. (2000) wykazali, że stężenie SAA wzrasta w wyniku oddziaływania na organizm cytokin prozapalnych, IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Zależność taka widoczna jest w przypadku aktywowanych cytokinami komórek nabłonka jelit, a wydzielane przez nie białko SAA uczestniczy w lokalnych procesach obronnych przewodu pokarmowego. Podobną zależność wykazaliśmy w naszych badaniach, w których stwierdziliśmy podwyższone stężenie SAA w tkance jelita cienkiego w dniu wylęgu w grupach ptaków, które otrzymywały probiotyk wieloszczepowy i chelat

Zn-Gly. Należy przypuszczać, że podaż wieloszczepowego probiotyku powoduje zasiedlenie przewodu pokarmowego pisklęcia pożytecznymi drobnoustrojami, w wyniku czego dochodzi do zmiany składu mikrobioty piskląt, syntezy i uwalniania SAA utrzymującego homeostazę w obrębie jelit oraz modulowania lokalnej odpowiedzi immunologicznej jelit. Warto podkreślić, że takich zależności nie wykazano w 7 dniu życia piskląt. Ponadto, w tym okresie nie wykazano także zmian stężenia SAA w surowicy i w wątrobie co sugeruje, że w organizmie nie toczy się proces zapalny. Jednakże, stwierdzone w 7 dniu życia piskląt wyższe stężenie SAA w tkankach jelita cienkiego i grubego w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* Zn w postaci chelatu glicynowego może wskazywać, że stosowanie *in ovo* związków cynku może wywołać reakcję stresową, np. skutek drażniącego działania pierwiastka na nabłonek jelitowy. Dochodzi wówczas do miejscowego, ograniczonego do tkanki jelit zaburzenia homeostazy, co objawia się wzrostem stężenia nie tylko SAA (Alsemgeest i in., 1995), ale także innych białek, np. haptoglobiny, której wysokie stężenie wykazaliśmy w 7 dniu po wylęgu u kurcząt, które otrzymywały *in ovo* Zn i probiotyk wieloszczepowy.

Analizując uzyskane wyniki badań warto zwrócić uwagę na brak zmian stężenia haptoglobiny w woreczku żółtkowym, surowicy i wątrobie w dniu wylęgu i w 7 dniu po wylęgu pomiędzy grupą kontrolną i grupami eksperymentalnymi. Haptoglobina (Hp/PIT54) (Georgieva i in., 2010) jest białkiem ostrej fazy wykazującym m.in. silne działanie przeciwzapalne, modulujące syntezę prostaglandyn i hamujące fagocytozę, aktywność bakteriobójczą komórek żernych (Rossbacher i in., 1999), i proliferację komórek T (Arredouani i in., 2003). Wzrost stężenia Hp stwierdzany jest zwykle w przebiegu infekcji, stanu zapalnego lub uszkodzenia tkanek, np. w zakażeniach wirusem IBV, choroby Gumboro, czy też w zaburzeniach retencji i zakażeniach woreczka żółtkowego (Nazifi i in., 2010; Nazifi i in., 2011; Mosleh i in., 2012). W naszym doświadczeniu brak zmian w stężeniu Hp w surowicy i woreczku żółtkowym pozwala wykluczyć infekcje, natomiast zmiany w zakresie innych APP (SAA, AGP) należy przypisać działaniu związków suplementowanych *in ovo*. Wykazany w 7 dniu badania wzrost stężenia Hp w tkance jelita cienkiego i grubego ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly może świadczyć o stopniowej kolonizacji przewodu pokarmowego przez bakterie stanowiące składową probiotyku oraz drobnoustroje środowiskowe, pobudzające lokalne mechanizmy odpornościowe. Wysokie stężenie Hp w tkance jelita cienkiego w dniu wylęgu w grupie ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy wskazuje na zasiedlanie jelit bakteriami probiotycznymi, co stymuluje komórki immunokompetentne systemu GALT do lokalnej syntezy Hp.

Jednym z ważniejszych APP produkowanych w wątrobie i wydzielanych do krwi jest białko wiążące mannozę (MBL, mannose-binding lectin) (Idowu i in., 2021). Białko to należy do grupy kolektywnych i odgrywa istotną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (Takahashi i in., 2006). Poprzez domenę rozpoznającą węglowodany wiąże się ono z mannozą i innymi cukrami na powierzchni drobnoustrojów chorobotwórczych i aktywuje mechanizmy obronne, takie jak fagocytoza, modulacja cytokin, wydzielanie immunoglobulin i aktywacja układu dopełniacza (Schou i in., 2010). Wzrost stężenia MBL u kur stwierdza się zazwyczaj w okresie od 3 do 7 dni po infekcji bakteryjnej lub wirusowej (Millet i in., 2007; Juul-Madsen i in., 2003; Juul-Madsen i in., 2007). Wykazano, że MBL pobudzając układ immunologiczny w tkankach chroni organizm przed układowym zakażeniem drobnoustrojami chorobotwórczymi, np. *P. multocida* (Schou i in., 2010). W naszym doświadczeniu wzrost stężenia MBL widoczny był w dniu wylęgu w woreczku żółtkowym w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Wzrost stężenia tego białka w wątrobie dotyczył natomiast grupy ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy oraz probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly. Uzyskane wyniki dowodzą, że probiotyczne bakterie podawane *in ovo*, dzięki kolonizacji przewodu pokarmowego rozwijającego się ptaka, uruchamiają mechanizmy odpornościowe, które pobudzają procesy rozpoznawania patogenów i aktywację swoistej odpowiedzi immunologicznej. Wzrost stężenia MBL w dniu wylęgu w woreczku żółtkowym i wątrobie może być także efektem zwiększonej produkcji tego białka pod wpływem niezakaźnych czynników stresowych (Norup i in., 2008), jakimi dla rozwijającego się kury są badane preparaty podawane *in ovo*. Korelując te wyniki z opublikowanymi przez nas danymi dotyczącymi stężenia enzymów antyoksydacyjnych należy przyjąć, że badane preparaty podawane *in ovo* nie wywołują zaburzeń równowagi procesów oksydacyjnych i antyoksydacyjnych, a w organizmie nie toczą się procesy zapalne związane ze stresem oksydacyjnym, o czym świadczą także niższe stężenia MBL w 7 dniu życia w surowicy i tkankach ptaków. Warto podkreślić, że statystycznie istotnie wyższe stężenie MBL wykazano także w 7 dniu eksperymentu w surowicy i tkance jelita grubego ptaków otrzymujących *in ovo* chelat Zn-Gly oraz w tkance jelita grubego ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly. Wyniki te sugerują, że podanie *in ovo* chelatu Zn-Gly może prowadzić do przejściowej reakcji stresowej u nowo wyklutych piskląt, związanej z oddziaływaniem wysoce biodostępnego, łatwo wchłanialnego cynku w formie organicznej, kumulującego się w tkankach i narządach.

Białkiem ostrej fazy specyficznym dla drobiu jest także α 1-kwaśna glikoproteina (AGP), syntetyzowana i wydzielana przez hepatocyty. AGP wykazuje właściwości przeciwzapalne i immunoregulacyjne i odgrywa istotną rolę w odpowiedzi organizmu we wczesnych stadiach

zapalenia i infekcji u kur (Murata i in., 2004; Hochepped i in., 2003). W badaniach nie stwierdzono wzrostu stężenia AGP w tkance wątrobowej w dniu wylęgu jak i w 7 dniu badania. Przeciwnie, wykazano niższe stężenie AGP w porównaniu do grupy kontrolnej w dniu wylęgu i w 7 dniu badania odpowiednio u ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że w wątrobie ptaków z grup eksperymentalnych nie dochodzi do wzmożonej syntezy tego białka. Można zatem domniemywać, że u kurcząt nie występują zakażenia bakteryjne ani wirusowe, które w warunkach naturalnych prowadzą do zwiększonej syntezy tego białka (Adler i in., 2001). Wzrost stężenia AGP w surowicy kurcząt w dniu wylęgu wykazany w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* chelat Zn-Gly koreluje z surowiczym wzrostem stężenia cytokin Il-1, Il-6 i TNF- α . Cytokiny te, a zwłaszcza Il-6, są uważane za czynniki stymulujące syntezę AGP w wątrobie i tkankach pozawątrobowych (Baumann i Gauldie, 1994). Jednakże, ich stężenie w dniu wylęgu w tkance wątrobowej, z wyjątkiem Il-1, było stosunkowo niskie. Zatem przejściowy wzrost stężenia AGP w surowicy może być efektem redystrybucji szybko wchłanianego Zn do tkanek kurczęcia.

Interesujące wyniki badań uzyskaliśmy w odniesieniu do stężenia białek ostrej fazy w woreczku żółtkowym w dniu wylęgu kurcząt. Najwyższe stężenie SAA, AGP i ceruloplazminy wykazaliśmy w grupie kurcząt, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. W przypadku MBL najwyższe stężenie stwierdzono w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Dokładne funkcje biologiczne tych białek u kurcząt w rozwijających się zarodkach nie są w pełni poznane, mimo że opisywano ich różnorodne oddziaływanie na organizm (Gruys i in., 2005). Dotychczas nie badano stężenia białek ostrej fazy u kurcząt w okresie bezpośrednio po wylęgu, zwłaszcza w woreczku żółtkowym. Białka ostrej fazy syntetyzowane są głównie w wątrobie, jednak u zwierząt gospodarskich ekspresję mRNA niektórych białek, np. AGP, stwierdzano także w narządach pozawątrobowych, takich jak płuca, nerki, śledziona, węzły chłonne, macica, jajniki oraz w płynie jajowodowym (Georgiou i in., 2007; Lecchi i in., 2009), w których produkcja APP miała charakter lokalny, a ich funkcje biologiczne często zależały od procesów glikozylacji. APP, takie jak AGP, SAA i inne mogą być produkowane lokalnie w obrębie jajowodu, lub pochodzić z surowicy kur niosek i tą drogą przedostawać się do jaja, w tym do żółtka, które zawiera od 16-18% białek (Yadgary i in., 2010), odgrywających istotną rolę w rozwoju embrionalnym kurczęcia. Dotychczas, metodą 1-D SDS-PAGE, LC-MS/MS i MS zidentyfikowano około 119 białek w obrębie żółtka jaja kurzego, wśród których dominuje albumina, witellogenina (VTG) i produkty jej denaturacji, apowitellenina, immunoglobulina Y (IgY), α -fetoproteina, białko wiążące retinol 4 i transtyretyna (Zhu i in., 2020; Wu i in., 2022). Do tej grupy białek należą także APP, takie jak AGP, SAA i

CP, których wysokie stężenia stwierdziliśmy w woreczku żółtkowym po wykluciu piskląt. Białka te mogą być także syntetyzowane bezpośrednio przez tkanki woreczka żółtkowego oddziałując na proces embriogenezy. Warto podkreślić, że APP są wydzielane także przez komórki, w których zachodzą reakcje stresowe (Speelman i in., 2022). Tak dzieje się w końcowym okresie rozwoju zarodka kurzego, w którym zmiany w metabolizmie lipidów żółtka, stanowiącego źródło energii do syntezy hormonów, błon strukturalnych oraz namnażania i wzrostu komórek, prowadzą do rozwoju stresu oksydacyjnego (Wong i Uni, 2021). Zmiany te mogą być przyczyną przejściowego wzrostu syntezy APP, o czym świadczy wykazany w doświadczeniu wzrost stężenia AGP, SAA i CP w woreczku żółtkowym w dniu wylęgu. Zmiany stężenia tych białek mogą być jednak także wynikiem podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-gly. Po podaniu tych preparatów przypuszczalnie dochodzi do zmian w mikrobiomie rozwijającego się kurczęcia, wczesnego zasiedlania przewodu pokarmowego bakteriami i zwiększenia wchłaniania wysoce biodostępnego Zn z kompleksu chelatowego z glicyną. W rezultacie Zn silniej oddziałuje na komórki rozwijającego się organizmu. Działanie to może mieć dwojaką naturę, tj. może prowadzić do rozwoju przemijającego lokalnego stanu zapalnego spowodowanego drażniącym działaniem Zn na komórki, które ulegają szybkim podziałom podczas wzrostu i rozwoju kurczęcia lub może być związane z konkurencyjnym oddziaływaniem drobnoustrojów probiotycznych i środowiskowych oraz przekazywanych do jaja przez kury niośki. Wyniki badań wykazały, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly współuczestniczą w ochronie antyoksydacyjnej z substancjami przeciwutleniającymi i enzymami antyoksydacyjnymi zawartymi w jaju. Dzięki temu zarodek kurzy jest mniej narażony na uszkodzenia w okresie przed- i po wylęgowym. Potwierdzeniem tej tezy jest wysokie stężenie ceruloplazminy wykazane w grupach eksperymentalnych, szczególnie w woreczku żółtkowym w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly.

5.5.2. Ocena stężenia i ekspresji mRNA immunoglobulin

Interesujących danych dostarczyły wyniki badań poziomu przeciwciał w surowicy i tkankach kurcząt oraz ekspresji mRNA immunoglobulin w jelitach. Badana w doświadczeniu IgY syntetyzowana jest przez limfocyty B kur niosek, wydzielana do krwi i przenoszona do żółtka jaja w celu zapewnienia pisklętom po wykluciu i w okresie rozwoju odporności humoralnej przeciwko powszechnie występującym patogenom, aż do pełnego rozwoju układu odpornościowego (Warr i in., 1995; Dias da Silva i Tambourgi, 2010). Znaczne ilości limfocytów B są produkowane w wątrobie zarodka, woreczku żółtkowym i szpiku kostnym a następnie, w okresie od 15 dnia inkubacji do 10 tygodnia życia, przemieszczają się do torby Fabrycjusza

(Masteller i Thompson, 1994; Ko i in., 2018). Można zatem oczekiwać, że podanie *in ovo* w 18 dniu inkubacji probiotyku wieloszczepowego, zawierającego liczne antygeny bakterii, m.in. *Lactobacillus* oraz Zn w postaci chelatu glicynowego wywoła reakcję ze strony limfocytów B w postaci syntezy przeciwciał. Analiza wyników badań wykazała jednak, że w woreczku żółtkowym w dniu wylęgu stężenie IgY jest równe lub mniejsze niż w grupie kontrolnej co może sugerować, że nie dochodzi do pobudzenia odpowiedzi typu humoralnego lub jest ona tłumiona przez te związki. Z drugiej strony, analiza stężenia tej immunoglobuliny w surowicy i w wątrobie w 7 dniu po wylęgu wykazała statystycznie istotny wzrost w grupie ptaków, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Może to sugerować, że specyficzne IgY dla kurczęcia, obecne głównie w surowicy, zaangażowane są w ochronę przed patogenami środowiskowymi. Tym niemniej, nie jest to reakcja na podawane preparaty, o czym świadczy niskie stężenie IgY w surowicy w 7 dniu życia piskląt w grupach eksperymentalnych, przemawiające za bezpieczeństwem ich stosowania *in ovo*. Nasze wyniki badań wskazują również, że w grupach piskląt, które otrzymały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy łącznie z chelatem Zn-Gly oraz sam chelat Zn-Gly stężenie IgY w jelicie cienkim w dniu wylęgu było wyższe niż w pozostałych grupach. Może to sugerować, że IgY pochodząca z żółtka jaja jak i syntetyzowana przez pisklę, obecna w jelitach cienkich, zaangażowana jest w zwalczanie patogenów jelitowych, w tym dostarczanych z mikroorganizmami tworzącymi probiotyk wieloszczepowy. Wydaje się, że wzrost stężenia IgY w grupach ptaków otrzymujących Zn w postaci wysoko biodostępnego chelatu glicynowego może być spowodowany wystąpieniem reakcji stresowej, np. wskutek drażniącego działania cynku na nabłonek jelitowy i reakcji kompensacyjnej organizmu, jak i nadmierną stymulacją enterocytów nabłonka jelitowego i pobudzeniem lokalnych mechanizmów immunologicznych, prowadzącym do wzmożonej proliferacji limfocytów B i syntezy przeciwciał w wyniku nadmiernej podaży cynku w postaci chelatu. Taką hipotezę potwierdza wysokie stężenie IgY w tkance jelita cienkiego w 7 dniu życia piskląt w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* chelat Zn-Gly. Należy jednak pamiętać, że wysoka biodostępność Zn może wywołać w organizmie lokalny proces zapalny (Bonaventura i in., 2015), a wysokie stężenie IgY ma na celu zapewnienie ochrony błony śluzowej jelit przed inwazją patogenów jelitowych. Wykazane w badaniach zmiany najprawdopodobniej mają charakter przejściowy i ograniczone są do błony śluzowej jelita. Co więcej, nie wykazaliśmy różnic w ekspresji mRNA IgY w tkance jelitowej w grupach eksperymentalnych w dniu wylęgu i w 7 dniu życia co potwierdza, że podawane *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly są bez-

pieczne dla organizmu i nie wywołują ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, a ich działanie ogranicza się do pobudzenia układu immunologicznego związanego z błoną śluzową MALT (mucosa-associated lymphoid tissue).

Podobnie jak IgY, także IgA i IgM są przekazywane przez kurę nioskę poprzez jajowód do białka jaja, a stąd przenoszone do organizmu rozwijającego się pisklęcia, głównie do jelita, poprzez płyn owodniowy (Chalghoumi i in., 2009). IgA odgrywa istotną rolę w odporności błony śluzowej, chroniąc przed drobnoustrojami, które namnażają się w organizmie (Wieland i in., 2006). Poprzez interakcję z komórkami nabłonkowymi M jelit IgA wiąże i przetwarza antygeny w celu wywołania specyficznej odpowiedzi immunologicznej (Heystek i in., 2002), dzięki czemu zapewnia ochronę pisklęcia przed zakażeniami wirusowymi i bakteryjnymi oraz inwazjami pasożytniczymi. IgM, produkowana przez aktywowane komórki B stymulowane antygenem, jest immunoglobuliną, która pojawia się jako pierwsza w początkowych stadiach odpowiedzi immunologicznej i odgrywa ważną rolę w aglutynacji i neutralizacji patogenów (Han i in., 2021; Gonzalez-Suarez i in., 2009). W naszym doświadczeniu stężenie IgA było wysokie w dniu wylęgu w woreczku żółtkowym w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Wykazany wzrost może być skutkiem transferu tych przeciwciał z białka do woreczka żółtkowego lub z jelita zarodka do woreczka żółtkowego poczynawszy od 14 dnia inkubacji (Kaspers i in., 1996). Wyższe stężenia IgA w surowicy wykazano w dniu wylęgu i w 7 dniu życia w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* chelat Zn-Gly, natomiast w wątrobie wzrost ten stwierdzono w dniu wylęgu w grupach ptaków, które otrzymywały probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn Gly i w 7 dniu życia w grupie ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Świadczyć to może o stymulacji humoralnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej przez probiotyk wieloszczepowy i Zn poprzez pobudzenie lokalnych komórek immunokompetentnych, w tym limfocytów B produkujących przeciwciała.

Interesujące wyniki uzyskaliśmy analizując stężenie IgA i IgM w tkance jelita cienkiego. W przypadku IgA w dniu wylęgu stwierdziliśmy niższe stężenie w grupach eksperymentalnych w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy w przypadku IgM w tym samym okresie wykazano tendencję odwrotną. W 7 dniu eksperymentu stężenia IgA i IgM w tkance jelita cienkiego były natomiast niższe lub porównywalne z grupą kontrolną. Wysokie stężenie IgA, występujące głównie w obrębie jelit, związane jest zazwyczaj z uszkodzeniem bariery jelitowej i ekspozycją na liczne antygeny (Fan i in., 2024). Wykazane w badaniach niskie stężenie tej immunoglobuliny w tkance jelita świadczy, że nie doszło do uszkodzenia bariery jelitowej. Także możliwość zmiany składu mikrobiomu, wywołana suplementacją *in ovo* probiotyku wie-

loszczepowego i dostarczenie do organizmu licznych antygenów nie prowadzą do rozwoju reakcji zapalnej. Potwierdzeniem tego stanu może być zmniejszona synteza cytokin prozapalnych, IFN- γ i TNF- α i zwiększona synteza cytokin przeciwzapalnych, IL-10 w tkance jelita cienkiego. Wzrost stężenia IgM w tkance jelitowej w dniu wylęgu w grupach eksperymentalnych jest prawdopodobnie efektem nasilenia odpowiedzi układu GALT na stymulację antygenową w procesie rearanżacji mikrobiomu jelitowego.

Analiza ekspresji mRNA badanych immunoglobulin wykazała, że zmiany w ekspresji wystąpiły dopiero w 7 dniu po wylęgu. W każdej z grup eksperymentalnych wykazaliśmy wyższą ekspresję mRNA w porównaniu do kontroli, przy czym w przypadku IgA największą ekspresję mRNA uzyskaliśmy w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly, a w przypadku IgM, w grupie ptaków które otrzymywały *in ovo* chelat Zn-Gly. Warto podkreślić, że probiotyki mogą zwiększać liczbę komórek produkujących IgA w błonie śluzowej i blaszce właściwej jelita (Levkut i in., 2014; Ohland i MacNaughton, 2010). Wykazany w badaniach wzrost ekspresji mRNA IgA i IgM dowodzi, że podanie mieszaniny korzystnie oddziałujących bakterii zawartych w probiotyku wieloszczepowym stymuluje komórki do produkcji tych immunoglobulin i w efekcie chroni nabłonek jelitowy przed kolonizacją i/lub inwazją patogennych drobnoustrojów, zapewniając homeostazę w obrębie jelit.

5.5.3. Ocena parametrów produkcyjnych

Podawanie probiotyków metodą *in ovo* wpływa nie tylko na skład mikrobioty jelitowej, ale także oddziałuje na programowanie wczesnych etapów życia brojlerów (Shehata i in., 2021). Wykazano, że wpływa ono m.in. na promowanie wzrostu i rozwoju kurcząt poprzez lepsze przyrosty masy ciała, zwiększone wykorzystanie paszy i poprawę ogólnego stanu zdrowia (Ren i in., 2025; Uni i in., 2005). Na poprawę parametrów produkcyjnych wpływa wiele czynników, w tym zwiększenie wysokości kosmków i głębokości krypt, zmniejszenie FCR oraz nasilenie procesów glukoneogenezy u kurcząt i ptaków dorosłych (El-Moneim i in., 2020; Das i in., 2021). Analizując uzyskane wyniki badań należy podkreślić, że zastosowanie probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly nie wpłynęło na zwiększenie BWG i FCR (0-42 dzień) u kurcząt, które otrzymywały *in ovo* badane związki. Przeciwnie, w grupie kurcząt, które otrzymywały *in ovo* jedynie probiotyk wieloszczepowy stwierdziliśmy niższe wartości BWG (0-42 dzień) w porównaniu do grupy kontrolnej i grup eksperymentalnych ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly oraz sam chelat Zn-Gly. Podobne wyniki uzyskali Majidi-Mosleh i in. (2016, 2017), którzy podając *in ovo* szczep *Bacillus subtilis*,

Enterococcus faecium i *Pediococcus acidilactici* nie stwierdzili zmian w parametrach wzrostowych ptaków. Autorzy ci zauważyli natomiast, że probiotyki mają korzystny wpływ na ekspresję genu mucyny i kolonizację mikrobiologiczną jelita czczego kurcząt oraz zalecili, oprócz technologii *in ovo*, dodatkową suplementację probiotykami *in vivo*. Odmienne wyniki uzyskali Ravichandran i in. (2018) którzy wykazali, że podanie *in ovo* różnych stężeń *Lactobacillus acidophilus* zwiększa masę ciała brojlerów w szóstym tygodniu życia. Także Shehata i in. (2022), wykazali, że podanie *in ovo* *B. subtilis* zwiększa BWG, FI i FCR w porównaniu z grupą kontrolną. Zdaniem autorów taki efekt należy łączyć z poprawą funkcjonowania jelit, zwiększeniem populacji korzystnych bakterii, zmniejszeniem populacji szkodliwych bakterii, regulacją ekspresji genów mucyny-2, czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), ko-transportera sodowo-glukozowego 1 (SGLT1) i interleukiny 2 (IL-2) w obrębie jelit oraz z pozytywnym wpływem na ich morfologię. Rozbieżne wyniki uzyskiwano także w odniesieniu do stosowania cynku *in ovo*. Kim i Kang (2022) nie wykazali istotnego wpływu cynku podawanego *in ovo* na przyrost masy ciała, spożycie paszy i FCR w okresie od 1-21 dnia życia. Efekty suplementacji były natomiast widoczne dopiero od 35 dnia życia, kiedy stwierdzono większą masę ciała kur, którym cynk podawano *in ovo* i dodatkowo w paszy. Hamza i in. (2022), wykazali natomiast, że zastosowanie *in ovo* ZnSO₄ lub ZnO-NPs zwiększa masę ciała kurcząt pomiędzy 21 i 35 dniem życia. Te rozbieżności wynikać mogą z oddziaływania licznych czynników wewnętrznych i zewnętrznych, które wpływają na parametry produkcyjne w przypadku stosowania techniki *in ovo*. Należą do nich m.in. dawka zastosowanych suplementów, skład mieszanki probiotyków, dzień podania, wybrana technika *in ovo*, miejsce podania, pochodzenie jaj wylęgowych, szczep/linia/rasa ptaków hodowlanych, warunki przechowywania jaj oraz zróżnicowanie mieszanek paszowych wykorzystywanych od momentu klucia do osiągnięcia wieku ubojowego 42 dni. Należy zaznaczyć, że wykorzystane w doświadczeniu i podawane *in ovo* drobnoustroje probiotyczne i chelat glicynowy Zn miały wyraźny wpływ na zdrowotność piskląt, o czym świadczą uzyskane wyniki badań. Brak widocznego wpływu cynku na tempo wzrostu może być spowodowany w pełni pokrywającym zapotrzebowanie stężeniem tego pierwiastka i innych składników odżywczych w jajach, z których pozyskiwano pisklęta do badań. Taką interpretacją posłużyli się m.in. Kop-Bozbay i Ocał (2015), którzy nie wykazali wpływu suplementacji aminokwasów *in ovo* na parametry produkcyjne, wykorzystując do wylęgu jaja o wzorcowej zawartości składników odżywczych. Analiza uzyskanych wyników badań wykazała że BWG w pierwszym okresie życia ptaków (0-10 dzień) był wyższy w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy z chelatem Zn-Gly oraz sam chelat Zn-Gly w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak wartości te nie były statystycznie istotne.

Podobne spostrzeżenia poczynili Khaligh i in. (2019), którzy u ptaków, którym suplementowano *in ovo* *Lactobacillus salivarius* i *Lactobacillus plantarum* uzyskali wyższą masę ciała w okresie pierwszych 10 dni po wykluciu. Prawdopodobnie przyczyną tego zjawiska były nasilone procesy wchłaniania substancji odżywczych przez woreczek żółtkowy po wykluciu, które stabilizowały się wraz z wiekiem kurcząt (Duan i in., 2021). Uzyskane w doświadczeniu, przejściowe zwiększenie BWG w pierwszych dniach po wykluciu może być efektem intensyfikacji metabolizmu wątrobowego jak i procesów wchłaniania substancji odżywczych z woreczka żółtkowego.

5.5.4. Ocena masy narządów limfatycznych

W doświadczeniu wykazano, że suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i chelatem Zn-Gly nie wpłynęła na rozwój i przyrost masy torby Fabrycjusza, grasicy i śledziony w okresie bezpośrednio po wykluciu. W 7 dniu życia ptaków statystycznie istotne różnice wykazano jedynie w odniesieniu do masy śledziony, która była wyższa we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu do kontroli, przy czym największe wartości osiągała w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy. Śledziona jest obwodowym narządem limfatycznym, pełniącym ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i humoralnego, jako miejsce różnicowania i proliferacji limfocytów po kontakcie z antygenami (Vali i in., 2023). Masa śledziony może być wykorzystywana jako wskaźnik odpowiedzi immunologicznej w chorobach zakaźnych lub biomarker w badaniach immunotoksikologicznych (John, 1994). Dotychczasowe badania wskazują, że suplementacja Zn, np. w postaci nanocząsteczek ZnONPs, zwiększa względną masę narządów układu odpornościowego takich jak grasica, torba Fabrycjusza i śledziona (El-Haliem i in., 2020). Podobny efekt stwierdzano po podaniu probiotyków *in ovo* i *in vivo*. (Pender i in., 2017). Również Duan i in. (2021) wykazali, że podanie *in ovo* synbiotyków prowadzi do zwiększenia masy narządów limfatycznych, w szczególności grasicy i śledziony, co przyczynia się do poprawy ogólnego stanu zdrowia kurcząt i zwiększenia odporności na patogeny. Podsumowując, Zn i probiotyki mają znaczący wpływ na układ odpornościowy stymulując produkcję limfocytów uczestniczących w odpowiedzi typu komórkowego i humoralnego, co przejawia się rozrostem narządów limfatycznych, m.in. śledziony. Potwierdzają to także nasze badania, w których wykazaliśmy, że podawanie *in ovo* wieloszczepowego probiotyku i chelatu Zn-Gly wywiera wielokierunkowy efekt stymulujący, przejawiający się m.in. wzrostem populacji prezentujących antygen limfocytów Th1 i komórek Treg CD4⁺CD25⁺ oddziałujących immunoregulacyjnie na komórki

Th1 i zapewniających utrzymywanie równowagi między odpowiedzią Th1/Th2. Należy podkreślić, że mikrobiota przewodu pokarmowego oraz jej metabolity ściśle współdziałają z komórkami w obrębie GALT kurcząt i odgrywają znaczną rolę w stymulacji lokalnych i ogólnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Wczesna kolonizacja jelit poprzez suplementację *in ovo*, np. z udziałem probiotyków, może zatem wzmacniać systemową odpowiedź organizmu kurcząt. Zwiększenie masy śledziony, widoczne w 7 dniu po wylęgu, jest efektem migracji i zasiedlania przewodu pokarmowego przez szczepy probiotyczne podawane *in ovo*, jakkolwiek nie można także wykluczyć stymulacji szczepami środowiskowymi. Mikrobiota modulowana w wyniku suplementacji *in ovo* aktywuje komórki immunokompetentne, głównie ILE i układu GALT, co prowadzi do zwiększenia migracji antygenów do śledziony. Następstwem obciążenia antygenowego jest zwiększenie reaktywności układu immunologicznego, prowadzące do rozrostu tego narządu, co jest istotne w kontekście zdrowotności i odporności ptaków (Fairbrother i in., 2004).

5.5.5. Ocena stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych

Ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej odgrywają cytokiny. Produkowane i uwalniane do krwiobiegu drobiu warunkują one prawidłową odpowiedź immunologiczną w procesie zapalnym, uczestniczą w syntezie białek fazy ostrej, chemotaksji oraz proliferacji i różnicowaniu komórek (Kogut, 2000; Zhong i in., 2019). Zjawiska te są szczególnie istotne w pierwszym tygodniu życia ptaków, gdy są one najbardziej podatne na zachorowania i padnięcia. Ze względu na niedojrzałość układu odpornościowego piskląt po wykluciu jednym ze sposobów stymulacji jego rozwoju jest zastosowanie immunomodulatorów na etapie życia zarodkowego, pobudzających układ immunologiczny (Pender i in., 2017). Do takich związków zaliczyć można zastosowane w naszym doświadczeniu probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Opublikowane dotychczas wyniki badań wykazały przydatność stosowania probiotyków *in vivo* do zwiększania liczby limfocytów T i modulowania produkcji cytokin prozapalnych typu Th1 i Th2 (Lee i in., 2010; Brisbin i in., 2010). Analogicznie, zastosowanie Zn w postaci chelatu glicynowego stymuluje komórkowe mechanizmy odpornościowe poprzez zwiększenie proliferacji limfocytów T, syntezę IL-2, TNF- α i IL-10, które regulują homeostazę w organizmie (Jarosz i in., 2017a,b). Interesujące wyniki badań uzyskano analizując stężenie cytokin w woreczku żółtkowym. W grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* sam probiotyk wieloszczepowy stwierdziliśmy wyższe stężenia IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ i TGF-1 β . Jednoczesne podanie probiotyku wieloszczepowego z chelatem Zn-Gly zwiększało natomiast stężenie IL-6, IL-8 i IFN- γ . Należy podkreślić, że już od 12 dnia inkubacji w narządach limfatycznych

kurcząt, m.in. w śledzionie, stwierdza się wysoką ekspresję IFN- γ , IL-4, IL-10 i IL-18, która utrzymuje się do 7 dnia po wykluciu (Abdul-Careem i in., 2007). Wykazany w doświadczeniu wzrost syntezy cytokin prozapalnych typu Th1 w woreczku żółtkowym, np. IL-1 β , może być efektem aktywacji wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego NF- κ B pod wpływem pobudzenia antygenowego (Rehman i in., 2021) przez szczepy bakterii zawarte w probiotyku. Podobnie, w przypadku ptaków, które otrzymywały Zn aktywacja ścieżek prozapalnych w trakcie rozwoju embrionalnego może być związana z intensyfikacją procesów metabolicznych, wykorzystujących ten pierwiastek do budowy strukturalnych elementów organizmu, w tym komórek uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej (Klasing, 2007).

W doświadczeniu wykazano, że bezpośrednio po wykluciu w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly stwierdzono niskie lub porównywalne z grupą kontrolną stężenie cytokin prozapalnych, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α i IFN- γ w surowicy i tkance wątrobowej. Podobne spostrzeżenia poczynili Alizadeh i in. (2020), którzy wykazali, że suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym zawierającym szczepy *Lactobacilli* obniża ekspresję genów cytokin prozapalnych w migdałkach jelit ślepych, co wskazuje na aktywność przeciwzapalną tych bakterii w jelicie. Także w naszym doświadczeniu wykorzystywaliśmy podawany *in ovo* probiotyk wieloszczepowy, zawierający szczepy *Lactobacillus*. Obniżone pod wpływem probiotyku stężenie niektórych cytokin, np. IL-2, syntetyzowanej przez aktywowane limfocyty T, biorącej udział w proliferacji i aktywacji komórek Th (pomocniczych) i Tc (cytotoksycznych) wskazuje na właściwości immunomodulacyjne bakterii u kurcząt nie narażonych wcześniej na infekcje wirusowe i bakteryjne. Niskie stężenia IL-6 i IL-8, będące efektem modulacji mikrobioty po suplementacji *in ovo* mogą świadczyć, że bakterie probiotyczne uczestniczą w utrzymywaniu homeostazy immunologicznej zapobiegając nadmiernemu rozwojowi reakcji zapalnej. W 7 dniu życia ptaków wykazaliśmy natomiast wzrost stężenia cytokin prozapalnych w wątrobie (IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, TNF- α) i surowicy (IL-6, IL-12, IFN- γ) w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Także Alizadeh i in. (2021) wykazali w 10 dniu życia ptaków, którym podawano *in ovo* mieszaninę *Lactobacilli*, wzrost ekspresji IFN- α , IFN- β , IL-8, IL-13, i IL-18 w śledzionie i wzrost ekspresji IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, i IL-18 w torbie Fabrycjusza. Uzyskane w doświadczeniu wyniki sugerują, że zastosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly moduluje odpowiedź immunologiczną, podtrzymuje równowagę pomiędzy syntezą cytokin Th1/Th2, hamuje procesy zapalne i stymuluje rozwój układu odpornościowego. Potwierdzeniem tej tezy może być wykazane wysokie stężenie IL-6, która wpływa na różnicowanie limfocytów T w kierunku fenotypu Th2 i stymuluje wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, co

prowadzi do wygaszania nadmiernej reakcji immunologicznej. Warto także zwrócić uwagę na wyniki odnoszące się do stężenia IL-8 i IFN- γ w surowicy, które bezpośrednio po wykluciu było niższe w grupach ptaków otrzymujących *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly w porównaniu do kontroli. IL-8 jest chemokiną wytwarzaną po aktywacji TLR (Kogut, 2002) i aktywuje neutrofile do uwalniania enzymów lizosomalnych w procesie fagocytozy (Wigley i Kaiser, 2003). IFN- γ bierze udział w aktywacji makrofagów i regulacji dojrzewania i różnicowania komórek Th, prowadząc do rozwoju odpowiedzi immunologicznej zależnej od komórek (Santhakumar i in., 2017; Giansanti i in., 2006). Stwierdzone w doświadczeniu hamowanie funkcji zapalnych może być efektem tłumienia odpowiedzi immunologicznej po zastosowaniu badanych suplementów, co mogłoby prowadzić do upośledzenia aktywacji komórek T, niezbędnych np. do skutecznej odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu wykonywanym po wykluciu (Haq i in., 2011). Zjawisko to można traktować także jako przejściowy proces obniżenia syntezy białek wynikający ze zmian metabolicznych, zachodzących podczas procesu kłucia piskląt (Meijer i in., 2024).

Analiza wyników badań dotyczących cytokiny przeciwzapalnej IL-10, hamującej odpowiedź typu Th1, a zwłaszcza zmniejszającej oddziaływanie IFN- γ na organizm (Opal i DePalo, 2000) wykazała, że stosowanie badanych związków zmniejszało stężenie IL-10 w surowicy i zwiększało jej stężenie w wątrobie w okresie po wylęgu w grupach ptaków, którym podawano *in ovo* chelat Zn-Gly. Wyższe stężenie IL-10 w wątrobie może wynikać z aktywacji limfocytów B spowodowanej bezpośrednią reakcją tych komórek z cynkiem lub z udziałem innych cytokin uwalnianych z komórek immunokompetentnych, co wzmacnia humoralne mechanizmy odpornościowe. O aktywacji komórek B świadczy również wzrost stężenia immunoglobulin IgA i IgY w wątrobie w badanych grupach. Niskie stężenie IL-8 w surowicy w grupach ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy wraz z chelatem Zn-Gly w korelacji z niskim stężeniem IFN- γ może wskazywać na brak procesów zapalnych w tym okresie lub na hamowanie odpowiedzi immunologicznej typu Th2. Podobnie, brak różnic w stężeniu IL-10 w 7 dniu życia w surowicy i spadek jej stężenia w wątrobie, zwłaszcza w grupie ptaków, które otrzymywały *in ovo* probiotyk wieloszczepowy wraz z chelatem Zn-Gly w korelacji z wysokimi stężeniami IFN- γ i TNF- α świadczą o hamowaniu odpowiedzi typu humoralnego.

Analiza stężenia cytokin w tkankach jelita cienkiego i grubego i w wątrobie wskazuje na tkankowo-specyficzne uwarunkowania regulujące syntezę cytokin zależną od rozwoju tkanek i narządów wraz z wiekiem kurczenia oraz od stymulacji antygenowej organizmu. Warto podkreślić, że w doświadczeniu nie wykazano dominacji określonej grupy cytokin, a wyniki badań wskazują na utrzymywanie równowagi w produkcji cytokin typu Th1 i Th2. Świadczy to o

nietoksycznym dla komórek oddziaływaniu suplementowanych *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly. Należy przyjąć, że zmienność stężenia cytokin w grupach doświadczalnych pomiędzy dniem wylęgu i 7 dniem życia zależna jest od wieku kurcząt i regulowana nie tylko czynnikami wewnętrznymi, ale także stopniem dojrzałości układu immunologicznego. Warto zauważyć, że w dniu wylęgu w jelitach stwierdzono niską ekspresję mRNA IgM, co wskazuje że mógł to być efekt aktywacji odpowiedzi prozapalnej, osłabiającej adaptacyjne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzone jednocześnie wysokie stężenie przeciwapalnej IL-10 w tkance jelita cienkiego i grubego po podaniu *in ovo* probiotyku wieloszczepowego wraz z chelatem Zn-Gly sugeruje natomiast istnienie mechanizmów równoważących profil odpowiedzi zapalnej, dzięki czemu dochodzi do przesunięcia odpowiedzi typu komórkowego w kierunku typu humoralnego.

6. WNIOSKI

1. Skojarzone podawanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly wywiera wielokierunkowy efekt stymulujący na układ odpornościowy zarodka i piskląt w pierwszym okresie po wykluciu, przyczyniając się do aktywacji komórkowych i humoralnych mechanizmów odporności.
2. Wysoka ekspresja cząsteczek $CD4^+$ i $CD8^+$ oraz wysoki odsetek komórek Treg $CD4^+CD25^+$ w krwi obwodowej i śledzionie piskląt po suplementacji *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i chelatem Zn-Gly dowodzi promowania komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, wyrażającego się wzrostem populacji limfocytów Th1 prezentujących antygen oraz immunoregulacyjnego działania tych suplementów na limfocyty Th1, co zapewnia utrzymywanie równowagi Th1/Th2.
3. Skojarzona suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i chelatem Zn-Gly stymuluje komórki immunokompetentne do zwiększonej ekspresji cytokin przeciwzapalnych (IL-10) przy jednoczesnym obniżeniu stężenia cytokin prozapalnych (IFN- γ , TNF- α) oraz pobudza syntezę białek ostrej fazy (SAA) i ekspresję mRNA IgA i IgM w tkance jelitowej, co wskazuje na aktywację lokalnej odporności błony śluzowej.
4. Skojarzone podawanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly odgrywa znaczącą rolę w utrzymywaniu równowagi oksydacyjno/antyoksydacyjnej począwszy od etapu rozwoju zarodka, zapewnia homeostazę i chroni ptaki przed nadmierną ogólnoustrojową reakcją zapalną poprzez zwiększenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej T-AOC, stężenia enzymów SOD i CAT, a także uwalniania cytokin o działaniu pro- i przeciwzapalnym, (TNF- α , IFN- γ i IL-10), które współuczestniczą w procesach odpowiedzi immunologicznej w okresie po wylęgu i w pierwszych dniach życia piskląt.
5. Suplementacja *in ovo* chelatu Zn-Gly może przyczyniać się do indukcji lokalnej reakcji stresowej w obrębie jelit, przejawiającej się zwiększoną peroksydacją lipidów i procesami utlenienia białek.
6. Skojarzone podawanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly stymuluje syntezę SFA, głównie kwasu stearynowego, palmitynowego i mirystynowego, zwiększa stosunek PUFA/SFA i zmniejsza stężenie MUFA, co przyczynia się do wzrostu i rozwoju tkanki mięśniowej.
7. Suplementacja *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly wywiera silny wpływ na metabolizm tłuszczów, co przekłada się na zmiany wskaźnika aterogennego (AI), trombogenego (TI) i proporcji kwasów tłuszczowych hipocholesterolemicznych

do hipercholesterolemicznych (h/H) oraz na niższą wartość wskaźnika S/P, co wskazuje na wysoką wartość prozdrowotną i dietetyczną pozyskiwanego mięsa.

8. Probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly podawane *in ovo* ograniczają syntezę MDA w tkankach co wskazuje, że preparaty te zmniejszają stres oksydacyjny u rozwijającego się zarodka i nowo wyklutego pisklęcia.
9. Analiza profili białkowych tkanek kurcząt dla dużych mas, przy użyciu metody SDS PAGE i dla małych mas polipeptydów, przy użyciu screeningu MALDI-TOF MS dowodzi, że probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly podawane *in ovo* stymulują procesy metaboliczne odpowiedzialne za prawidłowy wzrost i rozwój szybko dzielących się komórek, utrzymując homeostazę organizmu. Ponadto, poprzez uczestniczenie w procesach regulacji odpowiedzi immunologicznej i syntezę specyficznych białek badane suplementy zapewniają ochronę przeciwwzakaźną rozwijającym się embrionom i pisklętom w okresie powylęgowym.
10. Podanie *in ovo* Zn w postaci chelatu zwiększa stężenie tego pierwiastka w surowicy i tkankach drobiu oraz wpływa na jego wchłanianie i dystrybucję w narządach zarodka, w których jest on wykorzystywany do budowy tkanek oraz pełni rolę ochronną w stosunku do embrionu, uczestnicząc w procesach obrony antyoksydacyjnej.
11. Synergistyczne podawanie probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly *in ovo* zwiększa reaktywność immunologiczną ptaków już na etapie zarodka. Suplementacja *in ovo* stanowi więc skuteczne narzędzie wzmacniania odporności nowo wyklutych piskląt, co ma praktyczne implikacje dla profilaktyki zdrowotnej oraz ograniczania strat ekonomicznych w warunkach intensywnej produkcji drobiu.
12. Słabą stroną skojarzonego podawania *in ovo* probiotyków wieloszczepowych i chelatu cynkowo-glicynowego jest obniżenie wskaźnika wylęgowości piskląt. Konieczne są zatem dalsze badania dotyczące wpływu tych preparatów na mechanizmy toksyczności, śmiertelność zarodków oraz regulację odpowiedzi immunologicznej zarodka na poziomie komórkowym.

7. STRESZCZENIE

Współczesna produkcja drobiarska dąży do uzyskiwania wysokiej wydajności chowu przy zapewnieniu zdrowotności brojlerów i ograniczonym stosowaniu antybiotyków w hodowli. Osiąganie tych celów wiąże się jednak z obniżeniem odporności ptaków, większą zachorowalnością i śmiertelnością piskląt oraz rozwojem lekooporności drobnoustrojów. Zjawiska te skłaniają do poszukiwania alternatywnych metod profilaktyki i stymulacji wzrostu, spośród których na uwagę zasługuje suplementacja dodatków bioaktywnych metodą *in ovo*. Wykazano, że dostarczanie tych związków na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego wpływa na zwiększenie przeżywalności piskląt, przyspiesza ich rozwój i wzmacnia odporność, ograniczając konieczność stosowania antybiotyków w odchowie. W badaniach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej oceniono wpływ podawania *in ovo* wieloszczepowego probiotyku zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu glicynowego cynku (Zn-Gly) na stan zdrowia, potencjał odporności i wskaźniki produkcyjne kurcząt brojlerów. Przyjęto założenie, że podanie kombinacji probiotyku i organicznej formy cynku na etapie zarodkowym przyczyni się do pobudzenia układu odpornościowego piskląt, zmniejszając podatność na infekcje w pierwszych dniach życia i ograniczając współczynnik śmiertelności. Suplementacja *in ovo* wybranych dodatków paszowych powinna wpłynąć także na jakość pozyskiwanego mięsa i inne wskaźniki produkcyjne, co przełoży się na efekt ekonomiczny w hodowli brojlerów. Należałoby oczekiwać, że suplementacja probiotyku zawierającego Efektywne Mikroorganizmy (EM) i chelatu glicynowego cynku w 17 dniu inkubacji wywoła efekt synergistyczny, wyrażający się wzmocnieniem odporności humoralnej i komórkowej, zwiększeniem potencjału antyoksydacyjnego piskląt oraz intensyfikacją przemian metabolicznych, co ostatecznie przyczyni się do poprawy wskaźników odchovu.

W badaniach wykorzystano łącznie 1400 zapłodnionych jaj kurcząt brojlerów (Ross 308), podzielonych na cztery grupy. W 17 dniu inkubacji w każdej z grup dokonano suplementacji *in ovo* w objętości 500 µl/jajo: Grupa I (kontrolna) – 0,9% NaCl; Grupa II – probiotyk zawierający Efektywne Mikroorganizmy (EM); Grupa III – probiotyk zawierający Efektywne Mikroorganizmy (EM) i chelat glicynowy cynku (Zn-Gly); Grupa IV – chelat glicynowy cynku (Zn-Gly). Jaja inkubowano do wyklućcia, a pisklęta odchowywano do 42 dnia życia w standardowych warunkach. W okresie trwania doświadczenia rejestrowano wylęgowość, śmiertelność i wskaźniki produkcyjne, a w dniu 0 (12 godzin po wylęgu) i w 7 dniu życia piskląt pobierano próbki do badań laboratoryjnych. W badaniach tych dokonywano oceny fenotypowej subpopulacji limfocytów T i B w krwi i śledzenie metodą cytometrii przepływowej, określano stężenie

cytokin pro- i przeciwzapalnych, oznaczano stężenie immunoglobulin i białek ostrej fazy przy użyciu testów ELISA i qPCR dla mRNA Ig w jelicie biodrowym oraz dokonywano oceny statusu oksydacyjnego w surowicy i tkankach. Analizowano także profil kwasów tłuszczowych w mięśniach oraz podstawowe wskaźniki biochemiczne krwi. Ponadto, wykonano analizę proteomiczną przy użyciu metody SDS-PAGE i MALDI-TOF MS i oznaczono stężenie cynku w tkankach. Analiza i ocena wskazanych parametrów powinna w założeniu wyjaśnić mechanizmy oddziaływania badanych suplementów na organizm na poziomie molekularnym.

Skojarzona suplementacja *in ovo* z udziałem probiotyku (EM) i chelatu glicynowego cynku była dobrze tolerowana przez zarodki, jakkolwiek wywoływała nieznaczne obniżenie wylęgowości. Najniższy współczynnik wylęgu stwierdzono w grupie probiotyk (EM) + chelat glicynowy cynku, natomiast sam probiotyk wywierał znikomy wpływ na wylęgowość. W okresie odchowu pisklęta z grupy probiotycznej wykazywały mniejsze spożycie paszy i wolniejszy wzrost, a końcowa masa ciała była istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Kombinacja probiotyku i chelatu glicynowego cynku pozwalała na uzyskanie końcowej masy ciała porównywalnej lub wyższej niż w grupie kontrolnej, przy jednoczesnym lepszym wykorzystaniu paszy. W grupie, w której podawano tylko chelat glicynowy cynku uzyskiwano wyniki zbliżone do grupy kontrolnej. Śmiertelność piskląt była niska i porównywalna we wszystkich grupach co dowodzi, że suplementacja *in ovo* nie wpływała negatywnie na przeżywalność. Podawanie *in ovo* badanych suplementów wyraźnie wpływało na rozwój odporności ptaków. U piskląt otrzymujących probiotyk i chelat glicynowy cynku już w chwili wylęgu wykazano większy odsetek dojrzałych limfocytów T i B w krwi i śledzionie w porównaniu do kontroli i tendencja ta utrzymywała się do 7 dnia życia. Ponadto, w grupie tej stwierdzono korzystne zmiany profilu mediatorów odporności, w tym niższe stężenia cytokin prozapalnych i wyższe stężenia cytokin przeciwzapalnych, a także zwiększoną syntezę przeciwciał w błonie śluzowej jelit. W badaniach wykazano także pozytywny wpływ suplementacji *in ovo* z użyciem probiotyku i chelatu glicynowego cynku na równowagę oksydacyjną u piskląt. Ptaki z tej grupy cechowały się wyższym potencjałem antyoksydacyjnym oraz najniższym wskaźnikiem MDA w tkankach, co świadczy o ograniczeniu zjawiska stresu oksydacyjnego. U piskląt otrzymujących wyłącznie chelat glicynowy cynku stwierdzono natomiast oznaki stresu oksydacyjnego w jelitach, mimo ogólnego obniżenia MDA w porównaniu do kontroli. Analiza profilu kwasów tłuszczowych w mięśniach w grupie kurcząt otrzymujących probiotyk i chelat glicynowy cynku wskazuje na intensywny rozwój tkanki mięśniowej. Wykazany w badaniach zwiększony udział kwasów nasyconych przy jednoczesnej wyższej proporcji PUFA/SFA i niższym udziale MUFA w porównaniu z kontrolą przekłada się na korzystniejsze wskaźniki jakości tłuszczu. Mięso

pozyskiwane od ptaków z badanej grupy cechowało się niższym indeksem aterogenności i trombogenności oraz wyższym stosunkiem hipo- do hipercholesterolemicznych kwasów tłuszczowych (h/H). Dodatkowa analiza molekularna wykazała zwiększoną ekspresję białek związanych z metabolizmem i odpornością piskląt, a ocena parametrów biochemicznych świadczy o efektywnym wchłanianiu cynku.

Skojarzona suplementacja *in ovo* probiotyku (EM) i chelatu Zn-Gly wywiera wielokierunkowy, korzystny wpływ na wzrost i rozwój brojlerów. Już na etapie zarodkowym pobudza ona układ immunologiczny do wzmożonej aktywności, co wyraża się zwiększeniem odsetka dojrzałych limfocytów T i B i nasileniem syntezy immunoglobulin przy zachowaniu równowagi odpowiedzi komórkowej i humoralnej i jednoczesnym przeciwdziałaniu nadmiernym reakcjom zapalnym. Ponadto, suplementacja *in ovo* zwiększa potencjał antyoksydacyjny organizmu i ogranicza nasilenie stresu oksydacyjnego u młodych kurcząt. O korzystnym wpływie suplementacji *in ovo* świadczy także zmodyfikowany profil metabolizmu, lepsze wykorzystanie paszy i prozdrowotny profil lipidowy mięsa, wyrażający się obniżeniem wskaźników aterogenności i trombogenności tłuszczu, co świadczy o zwiększonej wartości dietetycznej. Chelat glicynowy cynku podawany metodą *in ovo* stanowi wartościowe źródło tego pierwiastka dla rozwijającego się zarodka, natomiast probiotyk dostarcza korzystnych mikroorganizmów stymulujących układ odpornościowy. Łączne podawanie obydwu suplementów wywiera efekt synergistyczny, widoczny jako pozytywny wpływ na wzrost i rozwój piskląt. Zastosowanie technologii *in ovo* z użyciem probiotyku (EM) i chelatu glicynowego cynku należy traktować jako obiecującą strategię zwiększania odporności i poprawy zdrowotności brojlerów od pierwszych dni życia. W warunkach produkcyjnych oddziaływanie badanych suplementów przekłada się na zwiększenie tempa wzrostu i wykorzystania paszy oraz poprawę jakości mięsa, co wpływa na efekt ekonomiczny, a pośrednio pozwala na ograniczanie stosowania antybiotyków w chowie drobiu.

Słowa kluczowe: kurczęta, *in ovo*, układ odpornościowy kurcząt, probiotyk wieloszczepowy, Efektywne Mikroorganizmy (EM), chelat glicynowy cynku (Zn-Gly)

8. SUMMARY

Modern poultry production pursues high productivity while ensuring broiler health and limiting the use of antibiotics in breeding. However, achieving these goals is associated with compromised bird immunity, increased chick morbidity and mortality, and the development of microbial drug resistance. These phenomena prompt the search for alternative methods of prophylaxis and growth stimulation, among which *in ovo* supplementation of bioactive additives is especially noteworthy. Studies have shown that supplying these compounds at an early stage of embryonic development increases chick survival, accelerates their development, and strengthens immunity, reducing the need for antibiotic use during rearing. The research that is the subject of this doctoral dissertation assessed the impact of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM) and zinc glycine chelate (Zn- Gly) on the health status, immune potential, and production parameters of broiler chickens. It hypothesized that the coupled administration of the probiotic and organic zinc at the embryonic stage would contribute to the stimulation of the chicks' immune system, diminishing susceptibility to infections in the first days of life and reducing the mortality rate. *In ovo* supplementation of selected feed additives was also expected to affect the quality of broiler meat and other production parameters, which would translate into economic effects in broiler farming. Furthermore, it was speculated that the supplementation of a probiotic containing Effective Microorganisms (EM) and zinc glycine chelate on the 17th day of incubation would produce a synergistic effect, expressed by strengthened humoral and cellular immunity, increased antioxidant potential of chicks, and intensified metabolic transformation, thereby ultimately contributing to improved production performance.

The study was conducted with a total of 1,400 fertilized eggs of broiler chickens (Ross 308), divided into four groups according to the preparation administered *in ovo*. On day 17 of incubation, the eggs were injected with 500 µL/egg of: Group I (control) – 0.9% NaCl; Group II – probiotic containing Effective Microorganisms (EM); Group III – probiotic containing Effective Microorganisms (EM) + zinc glycine chelate (Zn-Gly); and Group IV – zinc glycine chelate (Zn-Gly). The eggs were incubated until hatching, and chicks were reared until 42 days of age under standard conditions. Hatchability, mortality, and production rates were recorded throughout the experiment, and samples were collected for laboratory analyses on day 0 (12 hours post hatching) and on day 7 of chick life. The study involved phenotypic assessment of T and B lymphocyte subpopulations in blood and spleen using flow cytometry, determination of pro- and anti-inflammatory cytokine levels, determination of immunoglobulins and acute

phase proteins using ELISA and qPCR for Ig mRNA in the ileum, and assessment of the oxidative status in serum and tissues. Muscle fatty acid profiles and basic blood biochemical markers were analyzed as well. In addition, proteomic analysis was performed using SDS-PAGE and MALDI-TOF MS, and zinc concentration was determined in tissues. The analysis and evaluation of the indicated parameters was expected to explain the mechanisms behind the effects of the analyzed supplements on the body at the molecular level.

The combined *in ovo* supplementation with the probiotic (EM) and zinc glycine chelate was well tolerated by the embryos, although it caused a slight decrease in hatchability. The lowest hatchability rate was determined in the probiotic (EM) + zinc glycine chelate group, whereas the probiotic alone had a negligible effect on hatchability. Over the rearing period, the chicks from the probiotic group showed lower feed intake and slower growth, and their final body weights were significantly lower compared to those from the control group. The combined probiotic + zinc glycine chelate supplementation made their final body weights comparable to or higher than those of the control chicks, and improved their feed conversion ratio. The group administered only the zinc glycine chelate achieved results similar to those noted in the control group. The mortality rate of chicks was low and comparable across all groups, proving that the *in ovo* supplementation had no adverse effect on bird survival rate. In turn, it had a tangible influence upon the development of the birds' immunity. A higher percentage of mature T and B lymphocytes in the blood and spleen, compared to the control birds, was demonstrated in the chicks supplemented with the probiotic + zinc glycine chelate as early as at hatching, and this trend persisted until day 7 of life. Furthermore, positive changes in the immune mediator profile were observed in this group, including lower concentrations of proinflammatory cytokines and higher concentrations of anti-inflammatory cytokines, as well as enhanced antibody synthesis in the intestinal mucosa. The study also demonstrated a positive effect of the *in ovo* supplementation with probiotics + zinc glycine chelate on the oxidative homeostasis in chicks. The birds from this group also exhibited a higher antioxidant potential and the lowest MDA index in tissues, which indicates oxidative stress mitigation. However, the chicks administered only the zinc glycine chelate showed signs of oxidative stress in the intestines, despite the overall reduction in MDA compared to the control birds. Analysis of the fatty acid profile in muscles of the chickens from the combined supplementation group demonstrated intensive muscle tissue development. The increased proportion of saturated fatty acids, along with a higher PUFA/SFA ratio and a lower MUFA proportion compared to the control group, were indicative of the improved fat quality indicators. Meat of birds from this group had lower atherogenicity and thrombogenicity indices and a higher hypo- to hypercholesterolemic fatty

acid ratio (h/H). Additional molecular analysis revealed increased expression of proteins related to chick metabolism and immunity, while the assessment of biochemical markers indicated effective zinc absorption.

The study findings enable concluding that the combined *in ovo* supplementation with the probiotic (EM) and Zn-Gly chelate exerts a multifaceted, beneficial effect on broiler growth and development. It enhances the immune system activity already at the embryonic stage, which is reflected in increased percentages of mature T and B lymphocytes and boosted immunoglobulin synthesis, under preserved balance of cellular and humoral responses and simultaneous counteracting excessive inflammatory reactions. Furthermore, the *in ovo* supplementation increases the body's antioxidant potential and reduces the severity of oxidative stress in young chickens. Its beneficial effects are also evidenced by a modified metabolic profile, an improved feed conversion ratio, and a health-promoting lipid profile of meat, expressed by reduced atherogenic and thrombogenic fat indices, which indicates increased dietary value of meat. Zinc glycine chelate administered *in ovo* is a valuable source of this element for the developing embryo, while the probiotic provides beneficial microorganisms that stimulate the immune system. The combined administration of both supplements has a synergistic effect, noticeable in the positive impact on the growth and development of chicks. The application of the *in ovo* technology for probiotic (EM) and zinc glycine chelate administration should be considered a prospective strategy for increasing immunity and improving the health status of broiler chickens from the first days of life. Under production conditions, the effects of the analyzed supplements translate into increased growth rates and feed conversion ratio, as well as improved meat quality, which altogether impact economic viability and indirectly reduce the use of antibiotics in poultry farming.

Keywords: chicken, *in ovo*, chickens' immune system, multi-strain probiotics, Effective Microorganisms (EM), zinc glycine chelate (Zn- Gly)

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abd El-Ghany, W.A. (2025). *In ovo* vaccination technology: an alternative approach to post-hatch vaccination in modern poultry operations. *Microbiol. Res.* 16(1), 7. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16010007>
2. Abd El-Hack, M.E., El-Saadony, M.T., Shafi, M.E., Shaza, Y.A., Qattan, G.E., Batiha, F., Khafaga, A.F., Abdel-Moneim, A.E., Alagawany, M. (2020). Probiotics in poultry feed: a comprehensive review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 104(6), 1835-1850. <https://doi.org/10.1111/jpn.13454>
3. Abdel-Moneim, A.-M.E., Elbaz, A.M., Khidr, R.E.-S., Badri, F.B. (2020). Effect of *in ovo* inoculation of *Bifidobacterium* spp. on growth performance, thyroid activity, ileum histomorphometry, and microbial enumeration of broilers. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12, 873–882. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09613-x>
4. Abdollahi, M.R., Kamyab, A., Bazzazzadekan, A., Nik-khah, A., Shahneh, A.Z. (2003). Effect of different levels of bacterial probiotic on broilers performance. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 185. <https://doi.org/10.1017/S1752756200013442>
5. Abdul-Careem, M.F., Hunter, D.B., Lambourne, M.D., Barta, J., Sharif, S. (2007). Ontogeny of cytokine gene expression in the chicken spleen. *Poult. Sci.* 86(7), 1351–1355. <https://doi.org/10.1093/ps/86.7.1351>
6. Abreu, R., Semedo-Lemsaddek, T., Cunha, E., Tavares, L., Oliveira, M. (2023). Antimicrobial drug resistance in poultry production: current status and innovative strategies for bacterial control. *Microorganisms* 11(4), 953. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040953>
7. Abriouel, H., Franz, C.M., Ben Omar, N., Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
8. Adedokun, S.A., Olojede, O.C. (2019). Optimizing gastrointestinal integrity in poultry: the role of nutrients and feed additives. *Front. Vet. Sci.* 5, 348. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00348>
9. Adler, K.L., Peng, P.H., Peng, R.K., Klasing, K.C. (2001). The kinetics of hemopexin and alpha1-acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens. *Avian Dis.* 45(2), 289–296.
10. Ahmad, U., Sultan, A., Shuaib, M., Atif, M., Alqhtani, A.H., Pokoo-Aikins, A., Ullah, O., Siddiqui, S.A. (2024). The effects of poultry by-product meal and multi-strain

- probiotics on production performance, immune response, gut health and nutrient utilisation of broilers. *Ital. J. Anim. Sci.* 23(1), 1250–1257. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2024.2391084>
11. Ahmed, M.M.N., Ismail, Z.S.H., Abdel-Wareth, A.A.A. (2018). Application of prebiotics as feed additives in poultry nutrition – a review. *Egypt. Poult. Sci. J.* 38(1), 207–222. <https://doi.org/10.21608/epsj.2018.5601>
 12. Alaqil, A.A., Abbas, A.O., El-Beltagi, H.S., El-Atty, H.K.A., Mehaisen, G.M.K., Moustafa, E.S. (2020). Dietary supplementation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* modulates cholesterol levels, immune response, and productive performance of laying hens. *Animals* 10(9), 1588. <https://doi.org/10.3390/ani10091588>
 13. Albano, G.D., Gagliardo, R.P., Montalbano, A.M., Profita, M. (2022). Overview of the mechanisms of oxidative stress: impact in inflammation of the airway diseases. *Antioxidants* 11(11), 2237. <https://doi.org/10.3390/antiox11112237>
 14. Alberti, A., Bolognini, L., Macciantelli, D., Caratelli, M. (2000). The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediates*, 26, 253–267. <https://doi.org/10.1163/156856700X00769>
 15. Alirezaei Shahraki, P., Kheiri, F., Amanlou, H., Faghani, M., Jalali, S.M.A. (2024). Determining the optimal level and the effect of different zinc sources on performance, egg quality and the immune system of laying hens at the end of the production period. *Vet. Med. Sci.* 10(5), e70035. <https://doi.org/10.1002/vms3.70035>
 16. Alizadeh, M., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Karimi, S.H., Bavananthasivam, J., Kulkarni, R.R., Sharif, S. (2020). Effects of *in ovo* inoculation of multi-strain Lactobacilli on cytokine gene expression and antibody-mediated immune responses in chickens. *Front. Vet. Sci.* 7, 105. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00105>
 17. Alizadeh, M., Bavananthasivam, J., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Alqazlan, N., Boodhoo, N., Doost, J.S., Sharif, S. (2021). *In ovo* and oral administration of probiotic *Lactobacilli* modulate cell- and antibody-mediated immune responses in newly hatched chicks. *Front. Immunol.* 12, 664387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664387>
 18. Alsemgeest, S.P., Lambooy, I.E., Wierenga, H.K., Dieleman, S.J., Meerkerk, B., van Ederen, A.M., Niewold, T.A. (1995). Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves. *Vet. Q.* 17(1), 9–12. <https://doi.org/10.1080/01652176.1995.9694521>

19. Amorim, A., Rodrigues, S., Pereira, E., Teixeira, A. (2016). Physicochemical composition and sensory quality evaluation of capon and rooster meat. *Poult. Sci.* 95(5), 1211–1219. <https://doi.org/10.3382/ps/pev448>
20. Anzilotti, C., Swan, D.J., Boisson, B., Deobagkar-Lele, M., Oliveira, C., Chabosseau, P., Engelhardt, K.R., Xu, X., Chen, R., Alvarez, L., Berlinguer-Palmini, R., Bull, K.R., Cawthorne, E., Cribbs, A.P., Crockford, T.L., Dang, T.S., Fearn, A., Fenech, E.J., de Jong, S.J., Lagerholm, B.C., Ma, C.S., Sims, D., van den Berg, B., Xu, Y., Cant, A.J., Kleiner, G., Leahy, T.R., de la Morena, M.T., Puck, J.M., Shapiro, R.S., van der Burg, M., Chapman, J.R., Christianson, J.C., Davies, B., McGrath, J.A., Przyborski, S., Santibanez Koref, M., Tangye, S.G., Werner, A., Rutter, G.A., Padilla-Parra, S., Casanova, J.L., Cornall, R.J., Conley, M.E., Hambleton, S. (2019). An essential role for the Zn^{2+} transporter ZIP7 in B cell development. *Nat. Immunol.* 20, 350–361. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0295-8>
21. Apata, D.F. (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Sci. Food Agric.* 88(7), 1253-1258. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3214>
22. Arai, T., Yamada, H., Namba, T., Mori, H., Ishii, H., Yamashita, K., Sasada, M., Makino, K., Fukuda, K. (2004). Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. *Biochem. Pharmacol.* 67(6), 1185-1193. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.11.014>
23. Arredouani, M., Matthijs, P., Van Hoeyveld, E., Kasran, A., Baumann, H., Ceuppens, J.L., Stevens, E. (2003). Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 108(2), 144–151. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01569.x>
24. Asasi, K., Mohammadi, A., Boroomand, Z., Hosseinian, S.A., Nazifi, S. (2013). Changes of several acute phase factors in broiler chickens in response to infectious bronchitis virus infection. *Poult. Sci.* 92(8), 1989–1996. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02902>
25. Ashraf, R., Shah, N.P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54(7), 938-956. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.619671>
26. Awad, W.A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 88(1), 49-56. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00244>

27. Azad, M.A.K., Sarker, M., Li, T., Yin, J. (2018). Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed. Res. Int.* 2018, 9478630. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
28. Baba, S.P., Bhatnagar, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* 7, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>
29. Bai, K., Feng, C., Jiang, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, L., Wang, T. (2018). Dietary effects of *Bacillus subtilis* fmbj on growth performance, small intestinal morphology, and its antioxidant capacity of broilers. *Poult. Sci.* 97, 2312–2321. <https://doi.org/10.3382/ps/pey116>
30. Banaszak, M., Górna, I., Przysławski, J. (2021). Zinc and the innovative zinc- α 2-glycoprotein adipokine play an important role in lipid metabolism: a critical review. *Nutrients* 13(6), 2023. <https://doi.org/10.3390/nu13062023>
31. Bar Shira, E., Sklan, D., Friedman, A. (2005). Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105(1-2), 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.011>
32. Bartlett, J.R., Smith, M.O. (2003). Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poult. Sci.* 82(10), 1580–1588. <https://doi.org/10.1093/ps/82.10.1580>
33. Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 77(8), 1303–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.009>
34. Bastan, R., Eskandari, N., Sabzghabae, A.M., Manian, M. (2014). Serine/threonine phosphatases: classification, roles and pharmacological regulation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27(4), 473–484. <https://doi.org/10.1177/039463201402700402>
35. Baumann, H., Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol. Today* 15(2), 74–80. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6)
36. Belkaid, Y., Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157(1), 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
37. Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
38. Besong, E.E., Ashonibare, P.J., Obembe, O.O., Folawiyo, M.A., Adeyemi, D.H., Hamed, M.A., Akhigbe, T.M., Akhigbe, R.E. (2023). Zinc protects against lead-induced testicular damage via modulation of steroidogenic and xanthine oxidase/uric acid/caspase 3-

- mediated apoptotic signaling in male Wistar rats. *Aging Male* 26(1), 2224428. <https://doi.org/10.1080/13685538.2023.2224428>
39. Bhutani, N., Venkatraman, P., Goldberg, A. L. (2007). Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *The EMBO J.* 26(5), 1385–1396. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601592>
 40. Bielecka, A., Jamioł, M., Kankofer, M. (2021). Antioxidative and oxidative profiles in plasma and saliva in dairy cows during pregnancy. *Animals (Basel)* 11(11), 3204. <https://doi.org/10.3390/ani11113204>
 41. Bonaventura, P., Benedetti, G., Albarède, F., Miossec, P. (2015). Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun. Rev.* 14(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.008>
 42. Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 6(1), a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
 43. Brisbin, J.T., Gong, J., Parvizi, P., Sharif, S. (2010). Effects of *Lactobacilli* on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(9), 1337–1343. <https://doi.org/10.1128/CVI.00143-10>
 44. Calefi, A.S., Quinteiro-Filho, W.M., Fukushima, A.R., da Cruz, D.S.G., de Siqueira, A., Salvagni, F.A., Namazu, L.B., Gomes, C.O.M.S., Ferreira, A.J.P., Palermo Neto, J. (2016). Dexamethasone regulates macrophage and CD4⁺CD25⁺ cell numbers in the chicken spleen. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 18(1), 93–100. <https://doi.org/10.1590/18069061-2015-0035>
 45. Caliendo, V., McKinney, P., Bailey, T., Kinne, J., Wernery, U. (2013). Serum amyloid A as an indicator of health status in falcons. *J. Avian Med. Surg.* 27(2), 83–89. <https://doi.org/10.1647/2011-026>
 46. Canfora, E.E., Meex, R.C.R., Venema, K., Blaak, E.E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15(5), 261–273. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0156-z>
 47. Cao, J., Henry, P.R., Guo, R., Holwerda, R.A., Toth, J.P., Littell, R.C., Miles, R.D., Ammerman, C.B. (2000). Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J. Anim. Sci.* 78(8), 2039–2054. <https://doi.org/10.2527/2000.7882039x>

48. Capcarova, M., Chmelnicna, L., Kolesarova, A., Massanyi, P., Kovacik, J. (2010). Effects of *Enterococcus faecium* M74 strain on selected blood and production parameters of laying hens. Br. Poult. Sci. 51(5), 614–620. <https://doi.org/10.1080/00071668.2010.513961>
49. Casey, J.R., Grinstein, S., Orłowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11(1), 50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
50. Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., Théwis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY): production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken – a review. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 13(2), 295–308.
51. Chand, N., Zahirullah, Khan, R.U., Shah, M., Naz, S., Tinelli, A. (2020). Zinc source modulates zootechnical characteristics, intestinal features, humoral response, and para-oxonase (PON1) activity in broilers. Trop. Anim. Health Prod. 52, 511–515. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02036-4>
52. Chand, N., Ali, P., Alhidary, I.A., Abdelrahman, M.A., Albadani, H., Khan, M.A., Seidavi, A., Laudadio, V., Tufarelli, V., Khan, R.U. (2021). Protective effect of grape (*Vitis vinifera*) seed powder and zinc-glycine complex on growth traits and gut health of broilers following *Eimeria tenella* challenge. Antibiotics 10(2), 186. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020186>
53. Chang, S., Chen, X., Huang, Z., Chen, D., Yu, B., Chen, H., He, J., Luo, J., Zheng, P., Yu, J., Luo, Y. (2018). Dietary sodium butyrate supplementation promotes oxidative fiber formation in mice. Anim. Biotechnol. 29(3), 212–215. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1358734>
54. Chang, S.Y., Belal, S.A., Kang, D.R., Choi, Y.I., Kim, Y.H., Choe, H.S., Heo, J.Y., Shim, K.S. (2018a). Influence of probiotics-friendly pig production on meat quality and physicochemical characteristics. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 38(2), 403–416. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.2.403>
55. Cherian, G. (2015). Nutrition and metabolism in poultry: role of lipids in early diet. J. Anim. Sci. Biotechnol. 6, 28. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0029-9>
56. Chiang, S.H., Hsieh, W.M. (1995). Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 8(2), 159–162. <https://doi.org/10.5713/ajas.1995.159>
57. Chichowski, M., Croom, W.J., Edens, F.W., MacBride, B.W., Qiu, R., Chiang, C.C., Daniel, L.R., Havenstein, G.B., Koci, M.D. (2007). Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal and colonic epithelium in chicks fed a

- direct-fed microbial, Primalac, and Salinomycin. Poult. Sci. 86(6), 1121-1132. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1121>
58. Choi, J., Kong, B., Bowker, B.C., Zhuang, H., Kim, W.K. (2023). Nutritional strategies to improve meat quality and composition in the challenging conditions of broiler production: a review. *Animals* 13(8), 1386. <https://doi.org/10.3390/ani13081386>
 59. Chon, H., Choi, B., Jeong, G., Lee, E., Lee, S. (2010). Suppression of proinflammatory cytokine production by specific metabolites of *Lactobacillus plantarum* 10hk2 via inhibiting NF- κ B and p38 MAPK expressions. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33(6), e41–e49. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.11.002>
 60. Christensen, V.L., Donaldson, W.E., Nestor, K.E. (1999). Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. *Br. Poult. Sci.* 40(2), 297–303. <https://doi.org/10.1080/00071669987737>
 61. Clavijo, V., Flórez, M.J.V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poult. Sci.* 97(3), 1006–1021. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>
 62. Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., Rodón, F.E., Skiba-Cassy, S., Crochet, S., Duclos, M.J., Rideau, N., Tona, K., Buyse, J., Bruggeman, V., Decuypere, E., Picard, M., Yahav, S. (2007). Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86(5), 795–800. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.795>
 63. Connolly, G., Campbell, W.W. (2023). Poultry consumption and human cardiometabolic health-related outcomes: a narrative review. *Nutrients* 15(16), 3550. <https://doi.org/10.3390/nu15163550>
 64. Cox, C.M., Dalloul, R.A. (2015). Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential *in ovo* application. *Benef. Microbes* 6(1), 45–52. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0062>
 65. Cristofori, F., Dargenio, V.N., Dargenio, C., Miniello, V.L., Barone, M., Francavilla, R. (2021). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body. *Front. Immunol.* 12, 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>
 66. Czachajda, M., Góral, A., Duszyńska, K., Dolepski, K., Żuk, K., Firlej, E. (2024). Short-chain fatty acids and their impact on human health – a review. *Med. Og. Nauki Zdr.* 30(3), 181–185. <https://doi.org/10.26444/monz/190750>

67. D'Alessandro, A.G., Maiorano, G., Kowaliszyn, B., Loiudice, P., Martemucci, G. (2012). How the nutritional value and consumer acceptability of suckling lamb meat is affected by the maternal feeding system. *Small Rumin. Res.* 106(2-3), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.001>
68. Dal Bosco, A., Cavallo, M., Menchetti, L., Angelucci, E., Cartoni Mancinelli, A., Vaudo, G., Marconi, S., Camilli, E., Galli, F., Castellini, C., Mattioli, S. (2024). The Healthy Fatty Index allows for deeper insights into the lipid composition of foods of animal origin when compared with the atherogenic and thrombogenicity indexes. *Foods* 13(10), 1568. <https://doi.org/10.3390/foods13101568>
69. Dalton, T.P., Chen, Y., Schneider, S.N., Nebert, D.W., Shertzer, H.G. (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37(10), 1511–1526. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.040>
70. Das, R., Mishra, P., Jha, R. (2021). *In ovo* feeding as a tool for improving performance and gut health of poultry: a review. *Front. Vet. Sci.* 8, 754246. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.754246>
71. De Grande, A., Leleu, S., Delezie, E., Rapp, C., De Smet, S., Goossens, E., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. (2020). Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. *Poult. Sci.* 99(1), 441–453. <https://doi.org/10.3382/ps/pez525>
72. De Oliveira, J.E., Uni, Z., Ferket, P.R. (2008). Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. *World's Poult. Sci. J.* 64(4), 488-499. <https://doi.org/10.1017/S0043933908000160>
73. de Roock, S., van Elk, M., van Dijk, M.E., Timmerman, H.M., Rijkers, G.T., Prakken, B.J., Hoekstra, M.O., de Kleer, I.M. (2010). Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. *Clin. Exp. Allergy* 40(1), 103-110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03344.x>
74. Deeming, D.C., Pike, T.W. (2013). Embryonic growth and antioxidant provision in avian eggs. *Biol. Lett.* 9(6), 20130757. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0757>
75. Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15(4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
76. Dennery, P.A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 81(3), 155–162. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>

77. Dev, K., Begum, J., Biswas, A., Kannoujia, J., Mir, N.A., Sonowal, J., Kant, R., Narender, T. (2021). Dietary *Lactobacillus acidophilus* and mannan-oligosaccharides alter lipid metabolism and health indices in broiler chickens. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 13(3), 633–646. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09717-9>
78. Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L.R., Scaldaferri, F. (2024). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern. Emerg. Med.* 19, 275–293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
79. Dias da Silva, W., Tambourgi, D.V. (2010). IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135(3–4), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011>
80. Duan, A.Y., Ju, A.Q., Zhang, Y.N., Qin, Y.J., Xue, L.G., Ma, X., Luan, W.M., Yang, S.B. (2021). The effects of *in ovo* injection of synbiotics on the early growth performance and intestinal health of chicks. *Front. Vet. Sci.* 8, 658301. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.658301>
81. Dunisławska, A., Sławińska, A., Stadnicka, K., Bednarczyk, M., Gulewicz, P., Józefiak, D., Siwek, M. (2017). Synbiotics for broiler chickens—*in vitro* design and evaluation of the influence on host and selected microbiota populations following *in ovo* delivery. *PLoS One* 12(1), e0168587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168587>
82. El-Haliem, H.S.A., Attia, F.A.M., Saber, H.S., Hermes, I.H. (2020). Impacts of zinc oxide nanoparticles supplementation in broiler diets on growth performance, some carcass characteristics and immune organs. *Egyptian J. Nutr. Feeds* 23(1), 113–122. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2020.95825>
83. Elibol, O., Brake, J. (2004). Identification of critical periods for turning broiler hatching eggs during incubation. *Br. Poult. Sci.* 45(5), 631–637. <https://doi.org/10.1080/00071660400006271>
84. El-Moneim, A.E.E.A., El-Wardany, I., Abu-Taleb, A.M., Wakwak, M.M., Ebeid, T.A., Saleh, A.A. (2020). Assessment of *in ovo* administration of *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* on performance, ileal histomorphometry, blood hematological and biochemical parameters of broilers. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12(2), 439–450. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09549-2>
85. EMRO. EM Research Organization (2010). *Working with EM Technology for a Sustainable Environment*. EMRO, Okinawa, Japan. Available at: <http://www.emsustains.co.uk>

86. Ernst, R.A., Bradley, F.A., Abbott, U.K., Craig, R.M. (2004). *Egg candling and breakout analysis*. ANR Publication 8134. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Available at: <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8134.pdf>
87. Esatu, W., Melesse, A., Dessie, T. (2011). Effect of effective microorganisms on growth parameters and serum cholesterol levels in broilers. *Afr. J. Agric. Res.* 6, 3841–3846. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.176>
88. Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res. Rev.* 567(1), 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
89. Ezzulddin, T.A., Jwher, D.M. (2022). Beneficial microorganisms in animal production and environment. *J. Appl. Vet. Sci.* 7(3), 64–71. <https://doi.org/10.21608/javs.2022.137968.1147>
90. Fairbrother, A., Smits, J., Grasman, K. (2004). Avian immunotoxicology. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 7(2), 105–137. <https://doi.org/10.1080/10937400490258873>
91. Fan, Y., Wang, Y., Xiao, H., Sun, H. (2024). Advancements in understanding the role of intestinal dysbacteriosis mediated mucosal immunity in IgA nephropathy. *BMC Nephrol.* 25, 203. <https://doi.org/10.1186/s12882-024-03646-3>
92. Fathi, M., Al-Homidan, I., Al-Dokhail, A., Ebeid, T., Abou-Emera, O., Alsagan, A. (2018). Effects of dietary probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on productive performance, immune response and egg quality characteristics in laying hens under high ambient temperature. *Ital. J. Anim. Sci.* 17(3), 804–814. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1425104>
93. Feng, J., Ma, W.Q., Xu, Z.R., Wang, Y.Z., Liu, J.X. (2007). Effects of iron glycine chelate on growth, haematological and immunological characteristics in weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134(3–4), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.02.005>
94. Feng, J., Ma, W.Q., Niu, H.H., Wu, X., Wang, Y. (2010). Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* 133(2), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8431-9>
95. Feng, Z., Zhu, H., Deng, Q., He, Y., Li, J., Yin, J., Gao, F., Huang, R., Li, T. (2018). Environmental pollution induced by heavy metal(loid)s from pig farming. *Environ. Earth Sci.* 77, 103–113. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7284-2>
96. Ferket, P.R. (2006). Incubation and *in ovo* nutrition affects neonatal development. In: *Proc. 33rd Annu. Carolina Poult. Nutr. Conf.*, New York, USA, pp. 18–30.

97. Fernandes, C.E., Vasconcelos, M.A., Ribeiro, M.A., Sarubbo, L.A., Andrade, S.A., Filho, A.B. (2014). Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. *Food Chem.* 160, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.055>
98. Fernández, M., Ordóñez, J.A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C., de la Hoz, L. (2007). Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chem.* 101(1), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.006>
99. Fletcher, D.L. (2002). Poultry meat quality. *World's Poult. Sci. J.* 58(2), 131–145. <https://doi.org/10.1079/WPS20020013>
100. Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(11), 917–929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>
101. Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., Kavanagh, T.J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
102. Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 239-257. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.23.040183.001323>
103. Frunză, G., Ciobanu, M.-M., Murariu, O.C., Radu-Rusu, R.-M., Boișteanu, P.-C. (2025). The fatty acid content, health lipid indices, and instrumental, histological, and sensory quality of hare meat (*Lepus europaeus Pallas*). *Foods* 14(2), 310. <https://doi.org/10.3390/foods14020310>
104. Gao, H., Dai, W., Zhao, L., Min, J., Wang, F. (2018). The role of zinc and zinc homeostasis in macrophage function. *J. Immunol. Res.* 2018, 6872621. <https://doi.org/10.1155/2018/6872621>
105. Gao, W., Huang, L., Zhang, X., Ma, X., Wang, W., Zheng, Y., Geng, W., Liu, C., Wei, S., Yang, L., Zhu, Y. (2021). Effect of maternal marginal zinc deficiency on development, redox status, and gene expression related to oxidation and apoptosis in an avian embryo model. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 9013280. <https://doi.org/10.1155/2021/9013280>
106. Gao, M., Ren, Y., Amalaradjou, M.A. (2025). *In ovo* probiotic supplementation enhances energy status and promotes growth in developing broiler embryos and hatchlings. *Poult. Sci.* 104(9), 105442. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105442>
107. Gatin, A., Billault, I., Duchambon, P., van der Rest, G., Sicard-Roselli, C. (2021). Oxidative radicals (HO• or N3•) induce several di-tyrosine bridge isomers at the protein

- scale. Free Radic. Biol. Med. 162, 461-470.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.324>
108. Gatt, M.E., Urieli-Shoval, S., Preciado-Patt, L., Fridkin, M., Calco, S., Azar, Y., Matzner, Y. (1998). Effect of serum amyloid A on selected *in vitro* functions of isolated human neutrophils. J. Lab. Clin. Med. 132(5), 414–420. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(98\)90112-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(98)90112-3)
 109. Georgieva, T.M., Koinarski, V.N., Urumova, V.S., Marutsov, P.D., Christov, T.T., Nikolov, J., Chaprazov, T., Walshe, K., Karov, R.S., Georgiev, I.P., Koinarski, Z.V. (2010). Effects of *Escherichia coli* infection and *Eimeria tenella* invasion on blood concentrations of some positive acute phase proteins (haptoglobin (PIT 54), fibrinogen and ceruloplasmin) in chickens. Rev. Med. Vet. 161(2), 84–89.
 110. Georgiou, A.S., Snijders, A.P., Sostaric, E., Aflatoonian, R., Vazquez, J.L., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A., Wright, P.C., Fazeli, A. (2007). Modulation of the oviductal environment by gametes. J. Proteome Res. 6(12), 4656–4666. <https://doi.org/10.1021/pr070349m>
 111. Geyra, A., Uni, Z., Sklan, D. (2001). The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. Br. J. Nutr. 86(1), 53-61. <https://doi.org/10.1079/BJN2001368>
 112. Ghaeni, M., Ghahfarokhi, K.N., Zaheri, L. (2013). Fatty acids profile, atherogenic (IA) and thrombogenic (IT) health lipid indices in *Leiognathus bindus* and *Upeneus sulphureus*. J. Mar. Sci. Res. Dev. 3, 138. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000138>
 113. Ghasemi, H.A., Shivazad, M., Mirzapour Rezaei, S.S., Karimi Torshizi, M.A. (2016). Effect of synbiotic supplementation and dietary fat sources on broiler performance, serum lipids, muscle fatty acid profile and meat quality. Br. Poult. Sci. 57(1), 71–83. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1098766>
 114. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. Free Radic. Biol. Med. 29, 1106–1114. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00394-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00394-4)
 115. Giansanti, F., Giardi, M.F., Botti, D. (2006). Avian cytokines – an overview. Curr. Pharm. Des. 12(24), 3083–3099. <https://doi.org/10.2174/138161206777947542>
 116. Givisiez, P.E.N., Moreira Filho, A.L.B., Santos, M.R.B., Oliveira, H.B., Ferket, P.R., Oliveira, C.J.B., Malheiros, R.D. (2020). Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for *in ovo* feeding technology. Poult. Sci. 99(12), 6774–6782. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.074>

117. Goel, A., Bhanja, S.K., Mehra, M., Pande, V. (2012). Does *in ovo* administration of zinc or iodine modulate differential expression of growth and immune related genes in broiler chickens. In: Proc. World's Poult. Congr., Salvador, Bahia, Brazil.
118. Goldstein, S., Czapski, G., Cohen, H., Meyerstein, D. (1994). Free radicals induced peptide damage in the presence of transition metal ions: A plausible pathway for biological deleterious processes. *Free Radic. Biol. Med.* 17(1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90003-5)
119. Goluch, Z., Rybarczyk, A., Poławska, E., Haraf, G. (2023). Fatty acid profile and lipid quality indexes of the meat and back fat from porkers supplemented with EM Bokashi probiotic. *Animals* 13(20), 3298. <https://doi.org/10.3390/ani13203298>
120. Gonzalez-Suarez, M.L., Salinas-Carmona, M.C., Pérez-Rivera, I. (2009). IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 57(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00575.x>
121. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177(2), 751–766.
122. Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A., Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 6(11), 1045–1056. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>
123. Gržinić, G., Piotrowicz-Cieślak, A., Klimkowicz-Pawlas, A., Górny, R.L., Ławniczek-Wałczyk, A., Piechowicz, L., Olkowska, E., Potrykus, M., Tankiewicz, M., Krupka, M., Siebielec, G., Wolska, L. (2023). Intensive poultry farming: a review of the impact on the environment and human health. *Sci. Total Environ.* 858(3), 160014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160014>
124. Guarner, F., Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361(9356), 512-519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
125. Guérin, P., El Mouatassim, S., Ménéz, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7(2), 175-189. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
126. Gursky, O. (2020). Structural basis for vital function and malfunction of serum amyloid A: an acute-phase protein that wears hydrophobicity on its sleeve. *Curr. Atheroscler. Rep.* 22(11), 69. <https://doi.org/10.1007/s11883-020-00888-y>

127. Hafez, H.M., Attia, Y.A. (2020). Challenges to the poultry industry: current perspectives and strategic future after the COVID-19 outbreak. *Front. Vet. Sci.* 7, 516. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00516>
128. Haghighi, H.R., Gong, J., Gyles, C.L., Hayes, M.A., Zhou, H., Sanei, B., Chambers, J.R., Sharif, S. (2006). Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* 13(9), 975–980. <https://doi.org/10.1128/CVI.00161-06>
129. Hajsl, M., Hlavackova, A., Broulikova, K., Sramek, M., Maly, M., Dyr, J.E., Suttar, J. (2020). Tryptophan metabolism, inflammation, and oxidative stress in patients with neurovascular disease. *Metabolites* 10(5), 208. <https://doi.org/10.3390/metabo10050208>
130. Halder, N., Sunder, J., De, A.K., Bhattacharya, D., Joardar, S.N. (2024). Probiotics in poultry: a comprehensive review. *J. Basic Appl. Zool.* 85, 23. <https://doi.org/10.1186/s41936-024-00379-5>
131. Hamad, M.A., Hussein, S.A., Mahmoud, E.N., Al-Aalim, A.M. (2020). The inhibitory role of effective microorganisms on the growth of pathogenic bacteria. *Iraq J. Vet. Sci.* 34(1), 153-158. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.125653.1123>
132. Hamza, O.A., Hassan, H.A., Farroh, K.Y. (2022). Effect of different sources of zinc *in ovo* injection on hatching traits, growth and some physiological parameters of broiler chicks. *Fayoum J. Agr. Res. Dev.* 36(2), 160–174. <https://doi.org/10.21608/fjard.2022.257509>
133. Han, C., Wang, X., Zhang, D., Wei, Y., Cui, Y., Shi, W., Bao, Y. (2021). Synergistic use of florfenicol and *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide can enhance immune responses in broilers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 210, 111825. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111825>
134. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Front. Microbiol.* 9, 1791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
135. Haq, K., Elawadli, I., Parvizi, P., Mallick, A.I., Behboudi, S., Sharif, S. (2011). Interferon- γ influences immunity elicited by vaccines against very virulent Marek's disease virus. *Antiviral Res.* 90(3), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.04.001>
136. Harding, A.-H., Day, N.E., Khaw, K.-T., Bingham, S., Luben, R., Welsh, A., Wareham, N.J. (2004). Dietary fat and the risk of clinical type 2 diabetes: The European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk Study. *Am. J. Epidemiol.* 159(1), 73–82. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh004>

137. Hartcher, K.M., Lum, H.K. (2019). Genetic selection of broilers and welfare consequences: a review. *World's Poult. Sci. J.* 76(1), 154–167. <https://doi.org/10.1080/00439339.2019.1680025>
138. Haščík, P., Elimam, I., Garlík, J., Bobko, M., Tkáčová, J., Trembecká, L., Kačániová, M. (2014). Fatty acid content in broilers Ross 308 meat muscles after using bee pollen and probiotic as supplementary diet into their mixture. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 4(1), 67–69. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2014.4.1.67-69>
139. Hashemzadeh, Z., Karimi Torshizi, M.A., Rahimi, S., Razban, V., Zahraei Salehi, T. (2010). Prevention of *Salmonella* colonization in neonatal broiler chicks by using different routes of probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. *J. Agric. Sci. Technol.* 12, 425–432.
140. Hedlund, L., Palazon, T., Jensen, P. (2021). Stress during commercial hatchery processing induces long-time negative cognitive judgement bias in chickens. *Animals* 11(4), 1083. <https://doi.org/10.3390/ani11041083>
141. Hegde, M.N., Hegde, N.D., Ashok, A., Shetty, S. (2013). Evaluation of total antioxidant capacity of saliva and serum in caries-free and caries-active adults: An in-vivo study. *Indian J. Dent. Res.* 24, 164–167. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.116670>
142. Heystek, H.C., Moulon, C., Woltman, A.M., Garonne, P., van Kooten, C. (2002). Human immature dendritic cells efficiently bind and take up secretory IgA without the induction of maturation. *J. Immunol.* 168(1), 102–107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.102>
143. Hidayat, C., Sumiati, Jayanegara, A., Wina, E. (2020). Effect of zinc addition on the immune response and production performance of broilers: a meta-analysis. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 33(3), 465–479. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0146>
144. Higa, T., Wididana, H.G. (1989). The concept and theories of effective microorganisms. Proc. 1st Int. Conf. Kyusei Nature Farming, Oct 17-21, Khon Kaen, Thailand. International Nature Farming Research Center, Atami, Japan.
145. Higa, T., Parr, J.F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. Vol. 1. International Nature Farming Research Center, Atami, Japan.
146. Hochepied, T., Berger, F.G., Baumann, H., Libert, C. (2003). Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00054-0)

147. Hohtola, E. (2002). Facultative and obligatory thermogenesis in young birds: a cautionary note. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 733–739. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00011-9)
148. Hojyo, S., Fukada, T. (2016). Roles of zinc signaling in the immune system. *J. Immunol. Res.* 2016, 6762343. <https://doi.org/10.1155/2016/6762343>
149. Hossain, M.E., Ko, S.Y., Kim, G.M., Firman, J.D., Yang, C.J. (2012). Evaluation of probiotic strains for development of fermented *Alisma canaliculatum* and their effects on broiler chickens. *Poult. Sci.* 91(12), 3121–3131. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02333>
150. Hosseini-Mansoub, N., Vahdatpour, T., Arjomandi, M., Vahdatpour, S. (2011). Comparison of different methods of probiotic prescription against *Salmonella* infection in hatchery broiler chickens. *Adv. Environ. Biol.* 5(7), 1857–1860.
151. Hou, C.L., Zhang, J., Liu, X.T., Liu, H., Zeng, X.F., Qiao, S.Y. (2014). Superoxide dismutase recombinant *Lactobacillus fermentum* ameliorates intestinal oxidative stress through inhibiting NF- κ B activation in a trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis mouse model. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1621–1631. <https://doi.org/10.1111/jam.12461>
152. Hou, T., Tako, E. (2018). The *in ovo* feeding administration (*Gallus gallus*)—an emerging *in vivo* approach to assess bioactive compounds with potential nutritional benefits. *Nutrients* 10(4), 418. <https://doi.org/10.3390/nu10040418>
153. Huang, C., Jiao, H., Song, Z., Zhao, J., Wang, X., Lin, H. (2015). Heat stress impairs mitochondria functions and induces oxidative injury in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 93(5), 2144–2153. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8739>
154. Hue, O., Allain, V., Laisney, M.J., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., Rouxel, S., Quesne, S., Gloaguen, P.Y., Picherot, M., Santolini, J., Bougeard, S., Salvat, G., Chemaly, M. (2011). *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol.* 28(5), 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.003>
155. Hui, K.S., Saito, M., Hui, M., Saito, M., Lajtha, A., Yamamoto, K., Osawa, T. (1993). Two cytosolic puromycin-sensitive aminopeptidase isozymes in chicken brain: molecular homology to brain-specific 14-3-3 protein. *Neurochem. Int.* 22(5), 445–453. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(93\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0197-0186(93)90039-8)
156. Hussain, S., Khan, M., Sheikh, T.M.M., Mumtaz, M.Z., Chohan, T.A., Shamim, S., Liu, Y. (2022). Zinc essentiality, toxicity, and its bacterial bioremediation: a comprehensive insight. *Front. Microbiol.* 13, 900740. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900740>

157. Idowu, P.A., Idowu, A.P., Zishiri, O.T., Mpofu, T.J., Veldhuizen, E.J.A., Nephawe, K.A., Mtileni, B. (2021). Activity of mannose-binding lectin on bacterial-infected chickens – a review. *Animals* 11(3), 787. <https://doi.org/10.3390/ani11030787>
158. Ignatova, M., Sredkova, V., Marasheva, V. (2009). Effect of dietary inclusion of probiotic on chicken performance and some blood indices. *Biotechnol. Anim. Husb.* 25(5-6), 1079-1085.
159. Incharoen, T., Charoensook, R., Onoda, S., Tatrakoon, W., Numthuam, S., Pechkong, T. (2019). The effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 supplementation on growth performance, intestinal morphology, and immune-related gene expression in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 257, 114272. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114272>
160. Jarosz, Ł., Marek, A., Grądzki, Z., Kwiecień, M., Kalinowski, M. (2017a). The effect of feed supplementation with zinc chelate and zinc sulphate on selected humoral and cell-mediated immune parameters and cytokine concentration in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 112, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.007>
161. Jarosz, Ł., Marek, A., Grądzki, Z., Kwiecień, M., Żylińska, B., Kaczmarek, B. (2017b). Effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulfate on cytokine and immunoglobulin gene expression profiles in chicken intestinal tissue. *Poult. Sci.* 96(12), 4224–4235. <https://doi.org/10.3382/ps/pex253>
162. Jarosz, Ł., Marek, A., Grądzki, Z., Laskowska, E., Kwiecień, M. (2019). Effect of zinc sulfate and zinc glycine chelate on concentrations of acute phase proteins in chicken serum and liver tissue. *Biol. Trace Elem. Res.* 187(1), 258–272. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1346-6>
163. Jasim, M.S., Al-Qaisy, N.E. (2019). Effect of *in ovo* injection of zinc methionine on hatching traits, production performance and immunity response of broiler chickens. *Plant Arch.* 19(1), 1235–1240.
164. Jayapala, H.P.S., Lim, S.Y. (2023). N-3 polyunsaturated fatty acids and gut microbiota. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 26(5), 892–905. <https://doi.org/10.2174/1386207325666220701121025>
165. Jha, R., Singh, A.K., Yadav, S., Berrocoso, J.F.D., Mishra, B. (2019). Early nutrition programming (*in ovo* and post-hatch feeding) as a strategy to modulate gut health of poultry. *Front. Vet. Sci.* 6, 82. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00082>

166. Jha, R., Das, R., Oak, S., Mishra, P. (2020). Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: a systematic review. *Animals* 10(10), 1863. <https://doi.org/10.3390/ani10101863>
167. John, J.L. (1994). The avian spleen: a neglected organ. *Q. Rev. Biol.* 69(3), 327–351. <https://doi.org/10.1086/418649>
168. Joshua, P.P., Valli, C., Balakrishnan, V. (2016). Effect of *in ovo* supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chickens. *Vet. World* 9(3), 287–294. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.287-294>
169. Jung, U.J., Lee, M.K., Park, Y.B., Kang, M.A., Choi, M.S. (2006). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type 2 diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38(7), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.002>
170. Juul-Madsen, H.R., Munch, M., Handberg, K.J., Sørensen, P., Johnson, A.A., Norup, L.R., Jørgensen, P.H. (2003). Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with avian infectious bronchitis virus. *Poult. Sci.* 82(2), 235–241. <https://doi.org/10.1093/ps/82.2.235>
171. Juul-Madsen, H.R., Norup, L.R., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H. (2007). Mannan-binding lectin (MBL) serum concentration in relation to propagation of infectious bronchitis virus (IBV) in chickens. *Viral Immunol.* 20(4), 562–570. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0036>
172. Jwher, D.M.T., Abd, S.K., Mohammad, A.G. (2013). The study of using effective microorganisms (EM) on health and performance of broiler chicks. *Iraq J. Vet. Sci.* 27(2), 73-78.
173. Jwher, D.M.T. (2014). Effects of feeding effective microorganisms on blood levels of antibodies to Newcastle disease virus vaccine and trace element in broiler chicks. *Assiut Vet. Med. J.* 60(141), 38-44. <https://doi.org/10.21608/avmj.2014.170748>
174. Kadam, M.M., Barekatin, M.R., Bhanja, S.K., Iji, P.A. (2013). Prospects of *in ovo* feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications—a review. *J. Sci. Food Agric.* 93(15), 3654–3661. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6301>
175. Kaiser, P. (2010). Advances in avian immunology – prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* 39(5), 309–324. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.508777>
176. Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S., Ho, Y.W. (2003). Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of

- organs of broiler chickens. Br. Poult. Sci. 44(1), 139-144.
<https://doi.org/10.1080/0007166031000085445>
177. Karsten, S.L., Sang, T.K., Gehman, L.T., Chatterjee, S., Liu, J., Lawless, G.M., Sengupta, S., Berry, R.W., Pomakian, J., Oh, H.S., Schulz, C., Hui, K.S., Wiedau-Pazos, M., Vinters, H.V., Binder, L.I., Geschwind, D.H., Jackson, G.R. (2006). A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. Neuron 51(5), 549–560.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.019>
 178. Kaspers, B., Bondl, H., Göbel, T.W. (1996). Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken. Zentralbl. Veterinarmed. A. 43(4), 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1996.tb00448.x>
 179. Katalinić, V., Modun, D., Musić, I., Boban, M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 140(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>
 180. Khaligh, F., Hassanabadi, A., Nassiri-Moghaddam, H., Golian, A., Kalidari, G.A. (2019). Effect of probiotic administration route and dietary nutrient density on growth performance, gut health, and some hematological variables in healthy or *Eimeria*-infected broiler chickens. Iranian J. Appl. Anim. Sci. 9(3), 473–485.
 181. Khan, M.I., Chand, N., Naz, S., Alonaizan, R., Hu, H., Shamsi, S., Khan, R.U. (2024). Effects of zinc supplementation from organic and inorganic sources on growth, blood biochemical indices, and intestinal microarchitecture in broilers. Vet. Q. 44(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2023.2298491>
 182. Kidd, M.T., Ferket, P.R., Qureshi, M.A. (1996). Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. World's Poult. Sci. J. 52(3), 309-324.
<https://doi.org/10.1079/WPS19960022>
 183. Kim, H.J., Kang, H.K. (2022). Effects of *in ovo* injection of zinc or diet supplementation of zinc on performance, serum biochemical profiles, and meat quality in broilers. Animals 12(5), 630. <https://doi.org/10.3390/ani12050630>
 184. Klasing, K.C. (2007). Nutrition and the immune system. Br. Poult. Sci. 48(5), 525–537.
<https://doi.org/10.1080/00071660701671336>
 185. Ko, K.H., Lee, I.K., Kim, G., Gu, M.J., Kim, H.Y., Park, B.C., Park, T.S., Han, S.H., Yun, C.H. (2018). Changes in bursal B cells in chicken during embryonic development

- and early life after hatching. *Sci. Rep.* 8(1), 16905. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34897-4>
186. Kogut, M.H. (2000). Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29(5), 395–404. <https://doi.org/10.1080/030794500750047135>
 187. Kogut, M.H. (2002). Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella enteritidis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25(3), 159–172. [https://doi.org/10.1016/s0147-9571\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0147-9571(01)00035-2)
 188. Konieczka, P., Sandvang, D., Kinsner, M., Szkopek, D., Szyryńska, N., Jankowski, J. (2022). *Bacillus*-based probiotics affect gut barrier integrity in different ways in chickens subjected to optimal or challenge conditions. *Vet. Microbiol.* 265, 109323. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109323>
 189. Kop-Bozbay, C., Ocak, N. (2015). Body weight, meat quality and blood metabolite responses to carbohydrate administration in the drinking water during pre-slaughter feed withdrawal in broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99(2), 290–298. <https://doi.org/10.1111/jpn.12194>
 190. Kpodo, K.R., Proszkowiec-Weglarz, M. (2023). Physiological effects of *in ovo* delivery of bioactive substances in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* 10, 1124007. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1124007>
 191. Kucharski, M., Kaczor, U. (2014). Stearoyl-CoA desaturase – the lipid metabolism regulator. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 68, 334–342. <https://doi.org/10.5604/17322693.1095856>
 192. Kucuk, O., Sahin, N., Sahin, K. (2003). Supplemental zinc and vitamin A can alleviate negative effects of heat stress in broiler chickens. *Biol. Trace Elem. Res.* 94(3), 225–235. <https://doi.org/10.1385/BTER:94:3:225>
 193. Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A. (2002). Two antioxidative strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 72(3), 215–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00674-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00674-2)
 194. Kurash, J.K., Shen, C.N., Tosh, D. (2004). Induction and regulation of acute phase proteins in transdifferentiated hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 292(2), 342–358. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.09.002>
 195. Kwiecień, M., Kasperek, K., Grela, E., Jeżewska-Witkowska, G. (2015). Effect of caponisation on the production performance, slaughter yield and fatty acid profile of

- muscles of Greenleg Partridge cocks. *J. Food. Sci. Technol.* 52(11), 7227–7235. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1856-6>
196. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
 197. Lai, R., Juco, J., Lee, S.F., Nahirniak, S., Etches, W.S. (2000). Flow cytometric detection of CD79a expression in T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* 113(6), 823–830. <https://doi.org/10.1309/391R-93YF-DB4D-1L35>
 198. Lambo, M.T., Chang, X., Liu, D. (2021). The recent trend in the use of multistrain probiotics in livestock production: an overview. *Animals* 11(10), 2805. <https://doi.org/10.3390/ani11102805>
 199. Lammers, A., Wieland, W.H., Kruijt, L., Jansma, A., Straetemans, T., Schots, A., den Hartog, G., Parmentier, H.K. (2010). Successive immunoglobulin and cytokine expression in the small intestine of juvenile chicken. *Dev. Comp. Immunol.* 34(12), 1254–1262. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.07.001>
 200. Lecchi, C., Avallone, G., Giurovich, M., Roccabianca, P., Cecilian, F. (2009). Extrahepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues. *Vet. J.* 180(2), 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.027>
 201. Lee, K.W., Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Li, G.X., Jang, S.I., Babu, U.S., Park, M.S., Kim, D.K., Lillehoj, E.P., Neumann, A.P., Rehberger, T.G., Siragusa, G.R. (2010). Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89(2), 203–216. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00418>
 202. Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Jeong, M.S., Xu, S.Z., Kim, J.B., Park, H.J., Kim, H.R., Lillehoj, E.P., Bravo, D.M. (2014). Effects of *in ovo* injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 93(5), 1113–1121. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03770>
 203. Lee, S.H., Kim, C.N., Ko, K.B., Park, S.P., Kim, H.K., Kim, J.M., Ryu, Y.C. (2019). Comparisons of beef fatty acid and amino acid characteristics between Jeju Black Cattle, Hanwoo, and Wagyu breeds. *Food Sci. Anim. Resour.* 39(3), 402–409. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e33>
 204. Leksrisonpong, N., Romero-Sanchez, H., Plumstead, P.W., Brannan, K.E., Brake, J. (2007). Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poult. Sci.* 86(12), 2685–2691. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00170>

205. Levkut, M. Jr., Revajová, V., Levkutová, M., Kolesárová, M., Herich, R., Ševčíková, Z., Levkut, M. Sr. (2014). Mucin expression, IEL and cytokines in the caecum of broilers after administration EF55 and *S. enteritidis*. *J. Comp. Pathol.* 150(1), 94. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.11.079>
206. Li, Y., Huang, Y., Piao, Y., Nagaoka, K., Watanabe, G., Taya, K., Li, C. (2013). Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 23. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-23>
207. Li, Z., Yi, C.X., Katiraei, S., Kooijman, S., Zhou, E., Chung, C.K., Gao, Y., van den Heuvel, J.K., Meijer, O.C., Berbée, J.F.P., Heijink, M., Giera, M., Willems van Dijk, K., Groen, A.K., Rensen, P.C.N., Wang, Y. (2018). Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut* 67(7), 1269–1279. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314050>
208. Li, L.L., Gong, Y.J., Zhan, H.Q., Zheng, Y.X., Zou, X.T. (2019). Effects of dietary Zn-methionine supplementation on the laying performance, egg quality, antioxidant capacity, and serum parameters of laying hens. *Poult. Sci.* 98(2), 923–931. <https://doi.org/10.3382/ps/pey440>
209. Li, D.L., Wang, J.S., Liu, L.J., Li, K., Xu, Y.B., Ding, X.Q., Wang, Y.Y., Zhang, Y.F., Xie, L.Y., Liang, S., Wang, Y.X., Zhan, X.A. (2022). Effects of early post-hatch feeding on the growth performance, hormone secretion, intestinal morphology, and intestinal microbiota structure in broilers. *Poult. Sci.* 101(11), 102133. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102133>
210. Liu, C.C., Ahearn, J.M. (2005). Acute-phase proteins and inflammation: immunological and clinical implications. In: Lotze, M.T., Thomson, A.W. (Eds.), *Measuring Immunity*. Academic Press, pp. 131–143. <https://doi.org/10.1016/B978-012455900-4/50272-5>
211. Liu, Z.H., Lu, L., Wang, R.L., Lei, H.L., Li, S.F., Zhang, L.Y., Luo, X.G. (2015). Effects of supplemental zinc source and level on antioxidant ability and fat metabolism-related enzymes of broilers. *Poult. Sci.* 94(11), 2686–2694. <https://doi.org/10.3382/ps/pev251>
212. Loi, P.K., Tublitz, N.J. (2000). Roles of glutamate and FMRFamide-related peptides at the chromatophore neuromuscular junction in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J. Comp. Neurol.* 420(4), 499–511. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(20000515\)420:4<499::aid-cne7>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(20000515)420:4<499::aid-cne7>3.0.co;2-e)

213. Lu, P., Morawong, T., Molee, A., Molee, W. (2022). Influences of L-arginine *in ovo* feeding on hatchability, growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of slow-growing chickens. *Animals* 12(3), 392. <https://doi.org/10.3390/ani12030392>
214. Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B. (2012). CD4⁺ T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
215. Lukić, M., Petričević, V., Delić, N., Tolimir, N., Dosković, V., Rakonjac, S., Škrbić, Z. (2022). How does the choice of genotype and feed in the local market affect broiler performance and the farm economy? A case study in Serbia. *Agriculture* 12(6), 843. <https://doi.org/10.3390/agriculture12060843>
216. Lutful Kabir, S.M., Rahman, M.M., Rahman, B., Rahman, M.M., Ahmed, S.U. (2004). The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 3(5), 361-364. <https://doi.org/10.3923/ijps.2004.361.364>
217. Lutful Kabir, S.M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.* 10(8), 3531–3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>
218. MacDonald, R.S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *J. Nutr.* 130(5 Suppl), 1500S–1508S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>
219. Maehre, H.K., Dalheim, L., Edvinsen, G.K., Elvevoll, E.O., Jensen, I.J. (2018). Protein determination — method matters. *Foods* 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
220. Mahmoud, K.Z., Edens, F.W., Eisen, E.J., Havenstein, G.B. (2004). Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 137(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.09.013>
221. Majidi-Mosleh, A., Sadeghi, A.A., Mousavi, S.N., Chamani, M., Zarei, A. (2016). Ileal *MUC2* gene expression and microbial population, but not growth performance and immune response, are influenced by *in ovo* injection of probiotics in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 58(1), 40–45. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1237766>
222. Majidi-Mosleh, A., Sadeghi, A.A., Mousavi, S.N., Chamani, M., Zarei, A. (2017). Effects of *in ovo* infusion of probiotic strains on performance parameters, jejunal bacterial population and mucin gene expression in broiler chicken. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* (Special Issue Nutrition), 97–102. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0288>
223. Malheiros, R.D., Ferket, P.R., Gonçalves, F.M. (2012). Oxidative stress protection of embryos by *in ovo* supplementation. In: *Proc. World's Poult. Congr.*, 5–9 August, Salvador, Bahia, Brazil.

224. Mangan, M., Połtowicz, K., Metges, C.C., Siwekn M. (2025). Modulatory effects of *in ovo* delivery of galactooligosaccharide and *Lactiplantibacillus plantarum* on antioxidant capacity, gene expression, and selected plasma metabolite parameters of broiler chickens. J. Appl. Genet. 66, 421–434. <https://doi.org/10.1007/s13353-024-00931-7>
225. Mansoup, N.H. (2011). Comparative effect of butyric acid and probiotic on performance and serum composition of broiler chickens. Adv. Environ. Biol. 5(6), 1188-1191.
226. Mapiye, C., Chimonyo, M., Dzama, K., Hugo, A., Strydom, P.E., Muchenje, V. (2011). Fatty acid composition of beef from Nguni steers supplemented with *Acacia karroo* leaf-meal. J. Food Compos. Anal. 24(4-5), 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.018>
227. Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., D'Alessandro, A.G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. Oxygen 2, 48-78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
228. Mason, D.Y., Cordell, J.L., Brown, M.H., Borst, J., Jones, M., Pulford, K., Jaffe, E., Ralfkiaer, E., Dallenbach, F., Stein, H. (1995). CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. Blood 86(4), 1453–1459. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.4.1453.bloodjournal8641453>
229. Masteller, E.L., Thompson, C.B. (1994). B cell development in the chicken. Poult. Sci. 73(7), 998–1011. <https://doi.org/10.3382/ps.0730998>
230. Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M.E., Oeda, J., Masayasu, H., Takashima, A. (2003). Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. J. Immunol. 171(6), 3010-3018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3010>
231. Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., Rotondo, J.C. (2023). Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. Cells 12(1), 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
232. Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.P., Gaucher, M.L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S.K., Côté, C., Ramirez, A.A., Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. Anim. Nutr. 4(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
233. Meijer, M.M.Y., van den Brand, H., Palmieri, C., Niknafs, S., Khaskheli, A.A., Roura, E. (2024). Early-life immunomodulation by carvacrol delivered *in ovo* in broiler chickens. Poult. Sci. 103(12), 104286. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104286>

234. Meijerhof, R., Hulet, R.M. (1997). *In ovo* injection of competitive exclusion culture in broiler hatching eggs. J. Appl. Poult. Res. 6(3), 260–266. <https://doi.org/10.1093/japr/6.3.260>
235. Menzies, F.M., Hourez, R., Imarisio, S., Raspe, M., Sadiq, O., Chandraratna, D., O'Kane, C., Rock, K.L., Reits, E., Goldberg, A.L., Rubinsztein, D.C. (2010). Puromycin-sensitive aminopeptidase protects against aggregation-prone proteins via autophagy. Hum. Mol. Genet. 19(23), 4573–4586. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq385>
236. Mesquita, M.A., Araújo, I.C.S., Café, M.B., Arnhold, E., Mascarenhas, A.G., Carvalho, F.B., Stringhini, J.H., Leandro, N.S.M., Gonzales, E. (2021). Results of hatching and rearing broiler chickens in different incubation systems. Poult. Sci. 100(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.028>
237. Milićević, D., Vranić, D., Mašić, Z., Parunović, N., Trbović, D., Nedeljković-Trailović, J., Petrović, Z. (2014). The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. Lipids Health Dis. 13, 42. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-42>
238. Miller, M.M., Taylor, R.L.Jr. (2016). Brief review of the chicken Major Histocompatibility Complex: the genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance. Poult. Sci. 95(2), 375–392. <https://doi.org/10.3382/ps/pev379>
239. Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M., Klasing, K.C. (2007). Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. Dev. Comp. Immunol. 31(2), 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.05.013>
240. Mishra, B., Jha, R. (2019). Oxidative stress in the poultry gut: potential challenges and interventions. Front. Vet. Sci. 6, 60. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00060>
241. Mo, G., Hu, B., Wei, P., Luo, Q., Zhang, X. (2022). The role of chicken prolactin, growth hormone and their receptors in the immune system. Front. Microbiol. 13, 900041. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900041>
242. Mohan, J., Ali, S.A., Suvartan, R., Kapila, S., Sharma, R., Tomar, S.K., Behare, P., Yadav, H. (2018). Bioavailability of biotransformed zinc enriched dahi in wistar rats. Int. J. Probiotics Prebiotics 13(2-3), 45–54.
243. Mookiah, S., Sieo, C.C., Ramasamy, K., Abdullah, N., Ho, Y.W. (2014). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. J. Sci. Food Agric. 94(2), 341–348. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6365>

244. Moran, E.T. Jr. (2007). Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult. Sci.* 86(5), 1043–1049. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1043>
245. Morishita, T., Aye, P., Harr, B., Cobb, C., Clifford, J. (1997). Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Dis.* 41(4), 850-855.
246. Mosleh, N., Nazifi, S., Alaeddini, A. (2012). Changes in serum acute phase reactants, inflammatory mediators and gangliosides in Japanese quail (*Coturnix japonica*) with retained yolk sac. *Pak. Vet. J.* 32(2), 251–254.
247. Mottet, A., Tempio, G. (2017). Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poult. Sci. J.* 73(2), 245–256. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>
248. Mounir, M., Ibijbijen, A., Farih, K., Rabetafika, H.N., Razafindralambo, H.L. (2022). Synbiotics and their antioxidant properties, mechanisms, and benefits on human and animal health: a narrative review. *Biomolecules* 12(10), 1443. <https://doi.org/10.3390/biom12101443>
249. Mountzouris, K.C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult. Sci.* 86(2), 309–317. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.309>
250. Mrvcic, J., Prebeg, T., Barisic, L., Stanzer, D., Bacun-Druzina, V., Stehlik-Tomas, V. (2009). Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 47(4), 381–388.
251. Mu, G., Gao, Y., Tuo, Y., Li, H., Zhang, Y., Qian, F., Jiang, S. (2018). Assessing and comparing antioxidant activities of *Lactobacilli* strains by using different chemical and cellular antioxidant methods. *J. Dairy Sci.* 101(12), 10792–10806. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14989>
252. Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A., Raats, J.G. (2009). Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: a review. *Food Chem.* 112(2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.103>
253. Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168(1), 28–40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)
254. Murphy, M., Holmgren, A., Larsson, N., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., Nystrom, T., Belousov, V.,

- Schumacker, P.T., Winterbourn, C.C. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 13(4), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.010>
255. Murphy, J.P., Koch, V.W., Briscoe, J.A., Vinke, C.M., Schoemaker, N.J., Meijboom, F.L.B., van Zeeland, Y.R.A., Endenburg, N., Greenacre, C.B. (2016). Advancements in management of the welfare of avian species. In: Speer, B.L. (Ed.), *Curr. Ther. Avian Med. Surg.* W.B. Saunders, Philadelphia, USA, pp. 669–718. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4671-2.00031-8>
256. Muyyarikkandy, M.S., Schlesinger, M., Ren, Y., Gao, M., Liefeld, A., Reed, S., Amalaradjou, M.A. (2023). *In ovo* probiotic supplementation promotes muscle growth and development in broiler embryos. *Poult. Sci.* 102(7), 102744. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102744>
257. Naeem, M., Bourassa, D. (2025). Probiotics in poultry: unlocking productivity through microbiome modulation and gut health. *Microorganisms* 13(2), 257. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020257>
258. Nakamura, H., Sekiguchi, A., Ogawa, Y., Kawamura, T., Akai, R., Iwawaki, T., Makiguchi, T., Yokoo, S., Ishikawa, O., Motegi, S.I. (2019). Zinc deficiency exacerbates pressure ulcers by increasing oxidative stress and ATP in the skin. *J. Dermatol. Sci.* 95(2), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.07.004>
259. Naqvi, Z.H., Mushtaq-ul-Hassan, M., Chaudry, Z., Akram, M., Ahmad, R. (2000). Effect of effective microorganisms (EM4) on health of layers. *Pak. J. Biol. Sci.* 3(9), 1516–1518. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2000.1516.1518>
260. Naz, S., Idris, M., Khalique, M.A., Zia-Ur-Rahman, Alhidary, I.A., Abdelrahman, M.M., Khan, R.U., Chand, N., Farooq, U., Ahmad, S. (2016). The activity and use of zinc in poultry diets. *World's Poult. Sci. J.* 72(1), 159–167. <https://doi.org/10.1017/S0043933915002755>
261. Nazifi, S., Dadras, H., Hoseinian, S.A., Ansari-Lari, M., Masoudian, M. (2010). Measuring acute phase proteins (haptoglobin, ceruloplasmin, serum amyloid A and fibrinogen) in healthy and infectious bursal disease virus-infected chicks. *Comp. Clin. Pathol.* 19(3), 283–286. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0858-z>
262. Nazifi, S., Tabande, M.R., Hosseini, S.A., Ansari-Lari, M., Safari, H. (2011). Evaluation of sialic acid and acute-phase proteins (haptoglobin and serum amyloid A) in healthy and avian infectious bronchitis virus-infected chicks. *Comp. Clin. Pathol.* 20(1), 69–73. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0939-z>

263. Noor, R., Mittal, S., Iqbal, J. (2002). Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. *Med. Sci. Monit.* 8(9), RA210-5.
264. Norup, L.R., Jensen, K.H., Jørgensen, E., Sørensen, P., Juul-Madsen, H.R. (2008). Effect of mild heat stress and mild infection pressure on immune responses to an *E. coli* infection in chickens. *Animal* 2(2), 265–274. <https://doi.org/10.1017/S1751731107001097>
265. Noto, D., Fayer, F., Cefalù, A.B., Altieri, I., Palesano, O., Spina, R., Valenti, V., Pitrone, M., Pizzolanti, G., Barbagallo, C.M., Giordano, C., Averna, M.R. (2016). Myristic acid is associated with low plasma HDL cholesterol levels in a Mediterranean population and increases HDL catabolism by enhancing HDL particles trapping to cell surface proteoglycans in a liver hepatoma cell model. *Atherosclerosis* 246, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.036>
266. Nowaczewski, S., Babuszkiewicz, M., Szablewski, T., Stuper-Szablewska, K., Cegielska-Radziejewska, R., Tomczyk, Ł., Kaczmarek, S., Sechman, A., Lis, M.W., Kwaśniewska, M., Racewicz, P., Jarosz, Ł., Ciszewski, A., Nowak, T., Hejdysz, M. (2022). Effect of weight and storage time of broiler breeders' eggs on morphology and biochemical features of eggs, embryogenesis, hatchability, and chick quality. *Animal* 16(7), 100564. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100564>
267. Obianwuna, U.E., Qiu, K., Chang, X.Y., Zhang, H.J., Wang, J., Qi, G.H., Sun, T.H., Su, Y.B., Wu, S.G. (2022). Enhancing egg production and quality by the supplementation of probiotic strains (*Clostridium* and *Brevibacillus*) via improved amino acid digestibility, intestinal health, immune response, and antioxidant activity. *Front. Microbiol.* 13, 987241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.987241>
268. Obianwuna, U.E., Agbai Kalu, N., Wang, J., Zhang, H., Qi, G., Qiu, K., Wu, S. (2023). Recent trends on mitigative effect of probiotics on oxidative-stress-induced gut dysfunction in broilers under necrotic enteritis challenge: a review. *Antioxidants* 12(4), 911. <https://doi.org/10.3390/antiox12040911>
269. Ohland, C.L., MacNaughton, W.K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298(6), G807–G819. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009>
270. Oke, O.E., Akosile, O.A., Oni, A.I., Opowoye, I.O., Ishola, C.A., Adebisi, J.O., Odeyemi, A.J., Adjei-Mensah, B., Uyanga, V.A., Abioja, M.O. (2024). Oxidative stress in poultry production. *Poult. Sci.* 103(9), 104003. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104003>
271. Oketch, E.O., Yu, M., Hong, J.S., Chaturanga, N.C., Seo, E., Lee, H., Hermes, R.G., Smeets, N., Taechavasonyoo, A., Kirwan, S., Rodriguez-Sanchez, R., Heo, J.M. (2024).

- Laying hen responses to multi-strain *Bacillus*-based probiotic supplementation from 25 to 37 weeks of age. *Anim. Biosci.* 37(8), 1418–1427. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0495>
272. Olatunbosun, O.B., Sogunle, O.M., Adetola, O.O., Odutayo, O.J., Ayodeji, T.M., Ayoola, A.A., Abiona, J.A. (2022). *In ovo* feeding of organic salts of zinc and copper: effects on growth performance and health status of two strains of broiler chickens. *Trop. Agric. (Trinidad)* 99(2), 146–165.
 273. Olejnik, K., Popiela, E., Opaliński, S. (2022). Emerging precision management methods in poultry sector. *Agriculture* 12(5), 718. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050718>
 274. Oliveira, T.F.B., Bertechini, A.G., Bricka, R.M., Kim, E.J., Gerard, P.D., Peebles, E.D. (2015). Effects of *in ovo* injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poult. Sci.* 94(10), 2488–2494. <https://doi.org/10.3382/ps/pev248>
 275. Ooi, L.G., Liong, M.T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int. J. Mol. Sci.* 11(6), 2499–2522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>
 276. Opal, S.M., DePalo, V.A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117(4), 1162–1172. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
 277. Palouj, J., Kazemi-Fard, M., Rezaei, M., Ansari-Piresaraei, Z. (2021). Effects of *in ovo* injection of nano zinc oxide on hatchability, immunity and antioxidant responses, and relative gene expressions of interleukin-2 and -12 in broiler chickens. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 11(3), 595–603.
 278. Pan, D., Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* 5(1), 108–119. <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>
 279. Panda, A.K., Rama Rao, S.S., Raju, V.L.N., Sharma, S.S. (2007). Effect of probiotic (*Lactobacillus sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders. *J. Sci. Food Agric.* 88(1), 43–47. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2921>
 280. Park, S.Y., Birkhold, S.G., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. (2004). Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction. *Biol. Trace Elem. Res.* 101(2), 147–163. <https://doi.org/10.1385/BTER:101:2:147>
 281. Park, C., Brietzke, E., Rosenblat, J.D., Musial, N., Zuckerman, H., Ragguett, R.M., Pan, Z., Rong, C., Fus, D., McIntyre, R.S. (2018). Probiotics for the treatment of depressive symptoms: an anti-inflammatory mechanism? *Brain Behav. Immun.* 73, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.07.006>

282. Patterson, J.A., Burkholder, K.M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry growth. *Poult. Sci.* 82(4), 627-631. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627>
283. Peluso, I., Roguzzini, A. (2016). Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Pathol. Res. Int.* 2016, 5480267. <https://doi.org/10.1155/2016/5480267>
284. Pender, C.M., Kim, S., Potter, T.D., Ritzi, M.M., Young, M., Dalloul, R.A. (2017). *In ovo* supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. *Poult. Sci.* 96(5), 1052–1062. <https://doi.org/10.3382/ps/pew381>
285. Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 956792. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>
286. Porter, N.A. (1986). Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* 19, 262–268. <https://doi.org/10.1021/ar00129a001>
287. Qureshi, M.A., Heggen, C.L., Hussain, I. (2000). Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev. Comp. Immunol.* 24(2–3), 103–119. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00067-1)
288. Radi, A.M., Abdel Azeem, N.M., EL-Nahass, E.S. (2021). Comparative effects of zinc oxide and zinc oxide nanoparticle as feed additives on growth, feed choice test, tissue residues, and histopathological changes in broiler chickens. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 5158–5167. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09888-6>
289. Raheem, A., Liang, L., Zhang, G., Cui, S. (2021). Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation. *Front. Immunol.* 12, 616713. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616713>
290. Ramiah, S.K., Awad, E.A., Mookiah, S., Idrus, Z. (2019). Effects of zinc oxide nanoparticles on growth performance and concentrations of malondialdehyde, zinc in tissues, and corticosterone in broiler chickens under heat stress conditions. *Poult. Sci.* 98(9), 3828–3838. <https://doi.org/10.3382/ps/pez093>
291. Ranjitkar, S., Lawley, B., Tannock, G., Engberg, R.M. (2016). Bacterial succession in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(8), 2399-2410. <https://doi.org/10.1128/AEM.02549-15>
292. Ravichandran, S., Kanagaraju, P., Umanan, K.K., Muthusamy, P., Rathnapraba, S., Srinivasan, G. (2018). *In ovo* delivery of *Lactobacillus acidophilus* on the growth and immune response of commercial broiler chicken. *Int. J. Chem. Stud.* 6(5), 2433–2436.

293. Rehman, M.S., Rehman, S.U., Yousaf, W., Hassan, F.U., Ahmad, W., Liu, Q., Pan, H. (2021). The potential of toll-like receptors to modulate avian immune system: exploring the effects of genetic variants and phytonutrients. *Front. Genet.* 12, 671235. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.671235>
294. Reine, T.M., Vuong, T.T., Jenssen, T.G., Kolset, S.O. (2014). Serglycin secretion is part of the inflammatory response in activated primary human endothelial cells *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 1840(8), 2498–2505. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.002>
295. Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Eng. Rev.* 4, 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
296. Ren, Y., Muiyarakandy, M.S., Gao, M., Lu, S., Reddyvari, R., Mathew, E., Kuttappan, D., Kosuri, P., Amalaradjou, M.A. (2025). Sustained *in-ovo* and in-feed probiotic supplementation promotes embryo development and post-hatch performance in broilers. *Poult. Sci.* 104(9), 105395. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105395>
297. Rhim, H., Kim, M., Gim, S., Han, J.I. (2024). Diagnostic value of serum amyloid A in differentiating inflammatory disorders in wild birds. *Front. Vet. Sci.* 11, 1284113. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1284113>
298. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R. (1991). Techniques in free radical research. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Eds. Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H. 22, Elsevier, 51–100. Amsterdam, The Netherlands.
299. Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., Schulin, R. (2013). Zinc and its importance for human health: an integrative review. *J. Res. Med. Sci.* 18(2), 144–157.
300. Rossbacher, J., Wagner, L., Pasternack, M.S. (1999). Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand. J. Immunol.* 50(4), 399–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00609.x>
301. Roto, S.M., Kwon, Y.M., Ricke, S.C. (2016). Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.* 3, 63. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00063>
302. Rubio, L.A. (2019). Possibilities of early life programming in broiler chickens via intestinal microbiota modulation. *Poult. Sci.* 98(2), 695–706. <https://doi.org/10.3382/ps/pey416>

303. Ruder, B., Atreya, R., Becker, C. (2019). Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20(8), 1887. <https://doi.org/10.3390/ijms20081887>
304. Şahan, Z., Kutay, H., Celik, L. (2021). Influence of effective microorganism supplementation to the drinking water on performance and some blood parameters of laying hens exposed to a high ambient temperature. *Braz. J. Poult. Sci.* 23(1), 1-6. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1351>
305. Salim, H.A., Abd-Allah, O.A., Fararh, K.M. (2011). Effect of feeding probiotic on hematological, biochemical properties and immune response in broiler. *Benha Vet. Med. J.* 22(2), 37-45.
306. Salma, U., Miah, A.G., Maki, T., Nishimura, M., Tsujii, H. (2007). Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poult. Sci.* 86(9), 1920–1926. <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.1920>
307. Santhakumar, D., Rubbenstroth, D., Martinez-Sobrido, L., Munir, M. (2017). Avian interferons and their antiviral effectors. *Front. Immunol.* 8, 49. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00049>
308. Schick, B.P., Gradowski, J.F., San Antonio, J.D. (2001). Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells. *Blood* 97(2), 449–458. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.2.449>
309. Schieber, M., Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
310. Schou, T.W., Permin, A., Christensen, J.P., Cu, H.P., Juul-Madsen, H.R. (2010). Mannan-binding lectin (MBL) in two chicken breeds and the correlation with experimental *Pasteurella multocida* infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33(3), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.08.010>
311. Selaledi, L.A., Hassan, Z.M., Manyelo, T.G., Mabelebele, M. (2020). The current status of the alternative use to antibiotics in poultry production: an African perspective. *Antibiotics* 9(9), 594. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090594>
312. Selvaraj, R.K. (2013). Avian CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Dev. Comp. Immunol.* 41(3), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.018>
313. Shah, M., Zaneb, H., Masood, S., Khan, R.U., Ashraf, S., Sikandar, A., Rehman, H.F.U., Rehman, H.U. (2019). Effect of dietary supplementation of zinc and multi-microbe

- probiotic on growth traits and alteration of intestinal architecture in broilers. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11, 931–937. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9424-9>
314. Shanmugasundaram, R., Selvaraj, R.K. (2011). Regulatory T cell properties of chicken CD4⁺CD25⁺ cells. *J. Immunol.* 186(4), 1997–2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002040>
 315. Shao, Y., Wang, Y., Li, X., Zhao, D., Qin, S., Shi, Z., Wang, Z. (2023). Dietary zinc supplementation in breeding pigeons improves the carcass traits of squabs through regulating antioxidant capacity and myogenic regulatory factor expression. *Poult. Sci.* 102(11), 102809. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102809>
 316. Shareef, A.M., Al-Dabbagh, A.S.A. (2009). Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of broiler chicks. *Iraq J. Vet. Sci.* 23, 23-29. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2009.189533>
 317. Shehata, A.M., Paswan, V.K., Attia, Y.A., Abdel-Moneim, A.E., Abougabal, M.S., Sharaf, M., Elmazoudy, R., Alghafari, W.T., Osman, M.A., Farag, M.R., Alagawany, M. (2021). Managing gut microbiota through *in ovo* nutrition influences early-life programming in broiler chickens. *Animals* 11(12), 3491. <https://doi.org/10.3390/ani11123491>
 318. Shehata, A.M., Paswan, V.K., Attia, Y.A., Abougabal, M.S., Khamis, T., Alqosaibi, A.I., Alnamshan, M.M., Elmazoudy, R., Abaza, M.A., Salama, E.A.A., El-Saadony, M.T., Saad, A.M., Abdel-Moneim, A.-M.E. (2022). *In ovo* inoculation of *Bacillus subtilis* and raffinose affects growth performance, cecal microbiota, volatile fatty acid, ileal morphology and gene expression, and sustainability of broiler chickens (*Gallus gallus*). *Front. Nutr.* 9, 903847. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.903847>
 319. Shen, X., Miao, S., Zhang, Y., Guo, X., Li, W., Mao, X., Zhang, Q. (2025). Stearic acid metabolism in human health and disease. *Clin. Nutr.* 44, 222–238. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.12.012>
 320. Shini, S., Bryden, W.L. (2021). Probiotics and gut health: linking gut homeostasis and poultry productivity. *Anim. Prod. Sci.* 62(12), 1090–1112. <https://doi.org/10.1071/AN20701>
 321. Shokraneh, M., Sadeghi, A.A., Mousavi, S.N., Esmaeilkhani, S., Chamani, M. (2020). Effects of *in ovo* injection of nano-selenium and nano-zinc oxide and high eggshell temperature during late incubation on antioxidant activity, thyroid and glucocorticoid hormones and some blood metabolites in broiler hatchlings. *Acta Sci. Anim. Sci.* 42, e46029. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v42i1.46029>

322. Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J.B., Ho, Y.W. (2017a). Probiotics: from isolation to application. J. Am. Coll. Nutr. 36(8), 666–676. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>
323. Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J.B., Ramasamy, K., Sieo, C.C., Ho, Y.W. (2017b). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health, and serum lipids of broiler chickens. PLoS ONE 12(5), e0175959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175959>
324. Shramko, V.S., Polonskaya, Y.V., Kashtanova, E.V., Stakhneva, E.M., Ragino, Y.I. (2020). The short overview on the relevance of fatty acids for human cardiovascular disorders. Biomolecules 10(8), 1127. <https://doi.org/10.3390/biom10081127>
325. Silva, A.P.D., Gallardo, R.A. (2020). The Chicken MHC: Insights into genetic resistance, immunity, and inflammation following infectious bronchitis virus infections. Vaccines 8(4), 637. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040637>
326. Siwek, M., Sławińska, A., Stadnicka, K., Bogucka, J., Dunisławska, A., Bednarczyk, M. (2018). Prebiotics and synbiotics – *in ovo* delivery for improved lifespan condition in chicken. BMC Vet. Res. 14, 402. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1738-z>
327. Sławińska, A., Siwek, M., Żylińska, J., Bardowski, J., Brzezińska, J., Gulewicz, K.A., Nowak, M., Urbanowski, M., Płowiec, A., Bednarczyk, M. (2014). Influence of synbiotics delivered *in ovo* on immune organ development and structure. Folia Biol. (Kraków) 62(3), 277–285. https://doi.org/10.3409/fb62_3.277
328. Smith, A.L., Hayday, A.C. (2000). An $\alpha\beta$ T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by $\gamma\delta$ cells. Immunology 101(3), 325–332. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00122.x>
329. Speake, B.K., Murray, A.M., Noble, R.C. (1998a). Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. Prog. Lipid Res. 37(1), 1–32. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(97\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(97)00012-X)
330. Speake, B.K., Noble, R.C., Murray, A.M. (1998b). The utilization of yolk lipids by the chick embryo. World's Poult. Sci. J. 54, 319–334. <https://doi.org/10.1079/WPS19980022>
331. Speelman, T., Dale, L., Louw, A., Verhoog, N.J.D. (2022). The association of acute phase proteins in stress and inflammation-induced T2D. Cells 11(14), 2163. <https://doi.org/10.3390/cells11142163>
332. Star, L., van der Klis, J.D., Rapp, C., Ward, T.L. (2012). Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. Poult. Sci. 91(12), 3115–3120. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02314>

333. Stawarska, A., Czerwonka, M., Wyrębiak, R., Wrzesień, R., Bobrowska-Korczak, B. (2021). Zinc affects cholesterol oxidation products and fatty acids composition in rats' serum. *Nutrients* 13(5), 1563. <https://doi.org/10.3390/nu13051563>
334. Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schröter, C., Thompson, M.W., Hersh, L.B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Schild, H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunology* 1(5), 413–418. <https://doi.org/10.1038/80852>
335. Sugiharto, S., Isroli, I., Yudiarti, T., Widiastuti, E. (2018). The effect of supplementation of multistrain probiotic preparation in combination with vitamins and minerals to the basal diet on the growth performance, carcass traits, and physiological response of broilers. *Vet. World* 11(2), 240–247. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.240-247>
336. Sumi, C.D., Yang, B.W., Yeo, I.C., Hahm, Y.T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.* 61(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
337. Sun, X., Lu, L., Liao, X., Zhang, L., Lin, X., Luo, X., Ma, Q. (2018). Effect of *in ovo* zinc injection on the embryonic development and epigenetics-related indices of zinc-deprived broiler breeder eggs. *Biol. Trace Elem. Res.* 185(2), 456–464. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1260-y>
338. Sunder, G.S., Panda, A.K., Gopinath, N.C.S., Rao, S.R., Raju, M.V.L.N., Reddy, M.R., Kumar, C.V. (2008). Effects of higher levels of zinc supplementation on performance, mineral availability, and immune competence in broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 17(1), 79–86. <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00029>
339. Surai, P.F. (1999). Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *Br. Poult. Sci.* 40(3), 397–405. <https://doi.org/10.1080/00071669987511>
340. Surai, P.F., Speake, B.K., Noble, R.C., Sparks, N.H.C. (1999). Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biol. Trace Elem. Res.* 68(1), 63–78. <https://doi.org/10.1007/BF02784397>
341. Surai, P.F. (2000). Effect of the selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *Br. Poult. Sci.* 41(2), 235–243. <https://doi.org/10.1080/713654909>
342. Surai, P.F. (2002). *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

343. Surai, P.F. (2006). Selenium in Nutrition and Health. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
344. Surai, P.F., Fisinin, V.I., Karadas, F. (2016). Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. Anim. Nutr. 2(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.01.001>
345. Swain, P.S., Rao, S.B.N., Rajendran, D., Dominic, G., Selvaraju, S. (2016). Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: a review. Anim. Nutr. 2(3), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.06.003>
346. Szymanski, N., Patterson, R.A. (2003). Effective Microorganisms (EM) and Wastewater Systems in Future Directions for On-site Systems: Best Management Practice. Proceedings of On-site '03 Conference by Patterson, R.A. and Jones, M.J. (Eds). Held at University of New England, Armidale 30th September to 2nd October 2003. Published by Lanfax Laboratories Armidale, 347-354.
347. Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D.C., Lammers, A., Alkie, T.N., Sharif, S. (2018). Effects of early feeding and dietary interventions on development of lymphoid organs and immune competence in neonatal chickens: A review. Vet. Immunol. Immunopathol. 201, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.05.001>
348. Takahashi, K., Ip, W.K.E., Michelow, I.C., Ezekowitz, R.A.B. (2006). The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. Curr. Opin. Immunol. 18(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.014>
349. Tako, E., Ferket, P.R., Uni, Z. (2005). Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. J. Nutr. Biochem. 16(6), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.002>
350. Tang, D., Wu, J., Jiao, H., Wang, X., Zhao, J., Lin, H. (2019). The development of antioxidant system in the intestinal tract of broiler chickens. Poult. Sci. 98(2), 664–678. <https://doi.org/10.3382/ps/pey415>
351. Tang, X., Liu, X., Liu, H. (2021). Effects of dietary probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on carcass traits, meat quality, amino acid, and fatty acid profile of broiler chickens. Front. Vet. Sci. 8, 767802. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.767802>
352. Tarr, E.A., Fidler, B.M., Gee, K.E., Anderson, C.M., Jager, A.K., Gallagher, N.M., Carroll, K.P., Fabian-Fine, R. (2019). Distribution of FMRFamide-related peptides and co-localization with glutamate in *Cupiennius salei*, an invertebrate model system. Cell Tissue Res. 376(1), 83-96. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2949-0>

353. Teague, K.D., Graham, L.E., Dunn, J.R., Cheng, H.H., Anthony, N., Latorre, J.D., Menconi, A., Wolfenden, R.E., Wolfenden, A.D., Mahaffey, B.D., Baxter, M., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G. (2017). *In ovo* evaluation of FloraMax®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Poult. Sci.* 96(7), 2074–2082. <https://doi.org/10.3382/ps/pew494>
354. Thongsong, B., Kalandakanond-Thongsong, S., Chavananikul, V. (2008). Effects of the addition of probiotic containing both bacteria and yeast or an antibiotic on performance parameters, mortality rate and antibiotic residue in broilers. *Thai J. Vet. Med.* 38(1), 1–8. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.2108>
355. Tian, F., Shao, C.Y., Wang, Y.Y., Liu, X.L., Ma, Y.F., Han, D.P. (2021). Dietary *Lactobacillus casei* can be used to influence intraepithelial lymphocyte migration and modulate mucosal immunity in chicks. *Br. Poult. Sci.* 62(4), 492-498. <https://doi.org/10.1080/00071668.2021.1889464>
356. Tian, X., Chen, H., Liu, H., Chen, J. (2021a). Recent advances in lactic acid production by lactic acid bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 193(12), 4151–4171. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03672-z>
357. Tona, K., Voemesse, K., N'nanlé, O., Oke, O.E., Kouame, Y.A.E., Bilalissi, A., Meteyake, H., Oso, O.M. (2022). Chicken incubation conditions: role in embryo development, physiology and adaptation to the post-hatch environment. *Front. Physiol.* 13, 895854. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.895854>
358. Trinchieri, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* 204(2), 239-243. <https://doi.org/10.1084/jem.20070104>
359. Tufarelli, V., Rossi, G., Laudadio, V., Crovace, A. (2017). Effect of a dietary probiotic blend on performance, blood characteristics, meat quality and faecal microbial shedding in growing-finishing pigs. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 47(6), 875–882. <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i6.15>
360. Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338(8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
361. Uni, Z., Smirnov, A., Sklan, D. (2003a). Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. *Poult. Sci.* 82(2), 320-327. <https://doi.org/10.1093/ps/82.2.320>

362. Uni, Z., Tako, E., Gal-Garber, O., Sklan, D. (2003b). Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. *Poult. Sci.* 82(11), 1747–1754. <https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1747>
363. Uni, Z., Ferket, P.R. (2004). Methods for early nutrition and their potential. *World's Poult. Sci. J.* 60(1), 101–111. <https://doi.org/10.1079/WPS20038>
364. Uni, Z., Ferket, P.R., Tako, E., Kedar, O. (2005). *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poult. Sci.* 84(5), 764–770. <https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764>
365. Urieli-Shoval, S., Linke, R.P., Matzner, Y. (2000). Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* 7(1), 64–69. <https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00012>
366. Valdéz, A., García, Y., Álvarez, V.M., Samon, A., Perez, E., Serrano, J.O., Rodriguez, Y., Berenguer, A. (2020). Effect of efficient microorganisms, native to Guantánamo, Cuba, on bioproductive and hematological indicators of pre-fattening pigs. *Cuban J. Agric. Sci.* 54(3), 365–373.
367. Vali, Y., Gumpenberger, M., Konicek, C., Bagheri, S. (2023). Computed tomography of the spleen in chickens. *Front. Vet. Sci.* 10, 1153582. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1153582>
368. Valsta, L.M., Tapanainen, H., Männistö, S. (2005). Meat fats in nutrition. *Meat Sci.* 70(3), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.016>
369. Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., De Buck, J., Vancanneyt, M., Swings, J., Herman, L., Heyndrickx, M. (2007). Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella enteritidis*. *J. Appl. Microbiol.* 102(4), 1095–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03164.x>
370. Vazquez, M.I., Catalan-Dibene, J., Zlotnik, A. (2015). B cell responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 74(2), 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.007>
371. Vignali, D.A. (1994). The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring Inst. Mitt.* 94, 133–147.
372. Wang, Z.G., Pan, X.J., Zhang, W.Q., Peng, Z.Q., Zhao, R.Q., Zhou, G.H. (2010). Methionine and selenium yeast supplementation of the maternal diets affects antioxidant activity of breeding eggs. *Poult. Sci.* 89(5), 931–937. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00268>

373. Wang, J., Ji, H.F., Wang, S.X., Zhang, D.Y., Liu, H., Shan, D.C., Wang, Y.M. (2012). *Lactobacillus plantarum* ZLP001: In vitro assessment of antioxidant capacity and effect on growth performance and antioxidant status in weaning piglets. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 25, 1153–1158. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12079>
374. Wang, M.Q., Tao, W.J., Ye, S.S., Du, Y.J., Wang, C., Shen, S.X. (2012a). Effects of dietary pharmacological zinc on growth, liver metallothionein, Cu, Zn-SOD concentration and serum parameters in piglets. J. Anim. Vet. Adv. 11(9), 1390-1394. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.1390.1394>
375. Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. Nutrients 9(5), 521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
376. Wang, H., Ni, X., Qing, X., Liu, L., Xin, J., Luo, M., Khalique, A., Dan, Y., Pan, K., Jing, B., Zeng, D. (2018). Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 improves blood parameters related to immunity in broilers experimentally infected with subclinical necrotic enteritis. Front. Microbiol. 9, 49. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00049>
377. Wang, Y., Zhang, L., Xu, Y., Ding, X., Wang, Y., Fu, A., Zhan, X. (2022). Impact of maternal and offspring dietary Zn supplementation on growth performance and antioxidant and immune function of offspring broilers. Antioxidants 11(12), 2456. <https://doi.org/10.3390/antiox11122456>
378. Wang, C., Xiao, S., Yang, Z. (2024). Enhancing laying performance and immunity via probiotic and vitamin additives during induced molting. Front. Vet. Sci. 11, 1387877. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1387877>
379. Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol. Today 16(8), 392–398. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)
380. Weese, J.S., Martin, H. (2011). Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. Can. Vet. J. 52(1), 43–46.
381. Wessely-Szponder, J., Bełkot, Z., Bobowiec, R., Kosior-Korzecka, U., Wójcik, M. (2015). Transport induced inflammatory responses in horses. Pol. J. Vet. Sci. 18(2), 407–413. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0052>
382. Wickramasuriya, S.S., Park, I., Lee, K., Lee, Y., Kim, W.H., Nam, H., Lillehoj, H.S. (2022). Role of physiology, immunity, microbiota, and infectious diseases in the gut health of poultry. Vaccines 10(2), 172. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020172>

383. Wieland, W.H., Orzáez, D., Lammers, A., Parmentier, H.K., Schots, A. (2006). Display and selection of chicken IgA Fab fragments. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110(1–2), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.09.012>
384. Wigley, P., Kaiser, P. (2003). Avian cytokines in health and disease. *Braz. J. Poult. Sci.* 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2003000100001>
385. Willemsen, H., Debonne, M., Swennen, Q., Everaert, N., Careghi, C., Han, H., Bruggeman, V., Tona, K., Decuypere, E. (2010). Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. *World's Poult. Sci. J.* 66(2), 177–188. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000243>
386. Wilson, K.M., Rodrigues, D.R., Briggs, W.N., Duff, A.F., Chasser, K.M., Bielke, L.R. (2019). Evaluation of the impact of *in ovo* administered bacteria on microbiome of chicks through 10 days of age. *Poult. Sci.* 98(11), 5949–5960. <https://doi.org/10.3382/ps/pez388>
387. Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Mieczan, T., Kwiatkowska, K., Jachimowicz, K. (2021). The effect of Cu, Zn and Fe chelates on the antioxidative status of thigh meat of broiler chickens. *Animal* 15(10), 100367. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100367>
388. Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Jachimowicz-Rogowska, K., Kislova, S., Zasadna, Z., Yanovych, D. (2023). Assessment of the chemical composition and nutritional quality of breast muscle from broiler chickens receiving various levels of Fe glycine chelate. *Agriculture* 13(7), 1455. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071455>
389. Wojciech, T., Stefania, K., Barbra, L. (2007). Effect of various forms of zinc applied in concentrate mixtures for broiler chickens on its bioavailability as well as meat composition and quality. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57(4), 577–581.
390. Wołoszyn, J., Haraf, G., Okruszek, A., Wereńska, M., Goluch, Z., Teleszko, M. (2020). Fatty acid profiles and health lipid indices in the breast muscles of local Polish goose varieties. *Poult. Sci.* 99(2), 1216–1224. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.026>
391. Wong, E.A., Uni, Z. (2021). Centennial review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poult. Sci.* 100(3), 100821. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.004>
392. Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66(1), 21–32. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6)
393. Wójcik, M., Bobowiec, R., Silmanowicz, P. (2005). Changes of bile secretion and liver peroxidation under influence of glucocorticoids in sheep. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DD Medicina Veterinaria*, 60, 132–140.

394. Wu, H.J., Wu, E. (2012). The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* 3(1), 4–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.19320>
395. Wu, R., Chen, C., Zhang, X. (2022). Label-free LC-MS/MS analysis reveals different proteomic profiles between egg yolks of silky fowl and ordinary chickens. *Foods* 11(7), 1035. <https://doi.org/10.3390/foods11071035>
396. Xiao, C., Comer, L., Pan, X., Everaert, N., Schroyen, M., Song, Z. (2024). Zinc glycinate alleviates LPS-induced inflammation and intestinal barrier disruption in chicken embryos by regulating zinc homeostasis and TLR4/NF- κ B pathway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 272, 116111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116111>
397. Xie, S., Li, Y., Suo, Y., Wang, Z., Zhang, B., Li, J., Huang, J., Wang, Y., Ma, C., Lin, D., Ma, T., Shao, Y. (2025). Effect of organic, nano, and inorganic zinc sources on growth performance, antioxidant function, and intestinal health of young broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* 203, 2776–2786. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04341-y>
398. Xu, H., Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 57–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071649>
399. Yadgary, L., Cahaner, A., Kedar, O., Uni, Z. (2010). Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 89(11), 2441–2452. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00681>
400. Yair, R., Uni, Z. (2011). Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. *Poult. Sci.* 90(7), 1523–1531. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01283>
401. Yair, R., Shahr, R., Uni, Z. (2013). Prenatal nutritional manipulation by *in ovo* enrichment influences bone structure, composition, and mechanical properties. *J. Anim. Sci.* 91(6), 2784–2793. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5548>
402. Yalçın, S., Özkan, S., Shah, T. (2022). Incubation temperature and lighting: effect on embryonic development, post-hatch growth, and adaptive response. *Front. Physiol.* 13, 899977. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.899977>
403. Yamawaki, R.A., Milbradt, E.L., Coppola, M.P., Rodrigues, J.C.Z., Andreatti Filho, R.L., Padovani, C.R., Okamoto, A.S. (2013). Effect of immersion and *in ovo* inoculation of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella enteritidis* after hatch. *Poult. Sci.* 92(6), 1560–1563. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02936>
404. Yang, S., Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol. Cell. Biochem.* 467(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03667-9>

405. Yang, C., Wang, S., Li, Q., Zhang, R., Xu, Y., Feng, J. (2024). Effects of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* HJLP-1 on growth performance, selected antioxidant capacity, immune function indices in the serum, and cecal microbiota in broiler chickens. *Animals* 14(5), 668. <https://doi.org/10.3390/ani14050668>
406. Yary, T., Virtanen, J.K., Ruusunen, A., Tuomainen, T.P., Voutilainen, S. (2016). Serum zinc and risk of type 2 diabetes incidence in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 33, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.11.001>
407. Yigit, A., Panda, A., Cherian, G. (2014). The avian embryo and its antioxidant defence system. *World's Poult. Sci. J.* 70(3), 563–574. <https://doi.org/10.1017/S0043933914000610>
408. Yongzhen, N., Weijiong, L. (1994). Report on the deodorizing effects of effective microorganisms (EM) in poultry production. Beijing, China, 73, 402–407.
409. Younas, S., Bukhari, D.A., Bibi, Z., Ullah, A., Rehman, A. (2025). Impact of multistrain probiotics on growth performance, immune response, and gut morphometry in broiler chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Poult. Sci.* 104(5), 105026. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105026>
410. Yousaf, S., Nouman, H.M., Ahmed, I., Husain, S., Waseem, M., Nadeem, S., Tariq, M., Sizmaz, O., Chudhry, M.F.Z. (2022). A review of probiotic applications in poultry: improving immunity and having beneficial effects on production and health. *Adv. Microbiol.* 61(3), 115–123. <https://doi.org/10.2478/am-2022.010>
411. Yu, L., Peng, Z., Dong, L., Wang, H., Shi, S. (2019). Enterococcus faecium NCIMB 10415 supplementation improves the meat quality and antioxidant capacity of muscle of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 103, 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/jpn.13097>
412. Yu, Q., Liu, H., Yang, K., Tang, X., Chen, S., Ajuwon, K.M., Degen, A., Fang, R. (2020). Effect of the level and source of supplementary dietary zinc on egg production, quality, and zinc content and on serum antioxidant parameters and zinc concentration in laying hens. *Poult. Sci.* 99(11), 6233–6238. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.029>
413. Zhang, L., Wang, J.S., Wang, Q., Li, K.X., Guo, T.Y., Xiao, X., Wang, Y.X., Zhan, X.A. (2018). Effects of maternal zinc glycine on mortality, zinc concentration, and antioxidant status in a developing embryo and 1-day-old chick. *Biol. Trace Elem. Res.* 181, 323–330. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1053-8>

414. Zhang, W.Q., Zhao, T.T., Gui, D.K., Gao, C.L., Gu, J.L., Gan, W.J., Huang, W., Xu, Y., Zhou, H., Chen, W.N., Liu, Z.L., Xu, Y.H. (2019). Sodium butyrate improves liver glycogen metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J. Agric. Food Chem.* 67(27), 7694–7705. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02083>
415. Zhang, L., Zhang, R., Jia, H., Zhu, Z., Li, H., Ma, Y. (2021). Supplementation of probiotics in water beneficial growth performance, carcass traits, immune function, and antioxidant capacity in broiler chickens. *Open Life Sci.* 16(1), 311–322. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0031>
416. Zhang, Y., Xie, L., Ding, X., Wang, Y., Xu, Y., Li, D., Liang, S., Wang, Y., Zhang, L., Fu, A., Zhan, X. (2022). Mechanisms underlying the protective effect of maternal zinc (ZnSO₄ or Zn-Gly) against heat stress-induced oxidative stress in chicken embryo. *Antioxidants* 11(9), 1699. <https://doi.org/10.3390/antiox11091699>
417. Zhao, M., Chu, J., Feng, S., Guo, C., Xue, B., He, K., Li, L. (2023). Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: a review. *Biomed. Pharmacother.* 164, 114985. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114985>
418. Zhong, Y., Wu, X., Li, J., Lan, Q., Jing, Q., Min, L., Ren, C., Hu, X., Lambert, A., Cheng, Q., Yang, Z. (2019). Multiplex immunoassay of chicken cytokines via highly-sensitive chemiluminescent imaging array. *Anal. Chim. Acta* 1049, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.050>
419. Zhou, T.X., Chen, Y.J., Yoo, J.S., Huang, Y., Lee, J.H., Jang, H.D., Shin, S.O., Kim, H.J., Cho, J.H., Kim, I.H. (2009). Effects of chitooligosaccharide supplementation on performance, blood characteristics, relative organ weight, and meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.* 88(3), 593–600. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00285>
420. Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., Li, W. (2010). Effect of dietary probiotic *Bacillus coagulans* on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poult. Sci.* 89(3), 588–593. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00319>
421. Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
422. Zhu, W., Zhang, J., He, K., Geng, Z., Chen, X. (2020). Proteomic analysis of fertilized egg yolk proteins during embryonic development. *Poult. Sci.* 99(5), 2775–2784. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.056>
423. Zong, G., Li, Y., Wanders, A.J., Alsema, M., Zock, P.L., Willett, W.C., Hu, F.B., Sun, Q. (2016). Intake of individual saturated fatty acids and risk of coronary heart disease in

US men and women: two prospective longitudinal cohort studies. *BMJ* 355, i5796.
<https://doi.org/10.1136/bmj.i5796>

424. Zuliani, G., Galvani, M., Leitersdorf, E., Volpato, S., Cavalieri, M., Fellin, R. (2009). The role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the treatment of dyslipidemias. *Curr. Pharm. Des.* 15(36), 4087–4093. <https://doi.org/10.2174/138161209789909773>
425. Zulkifli, I., Abdullah, N., Mohd Azrin, N., Ho, Y.W. (2000). Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Br. Poult. Sci.* 41(5), 593–597. <https://doi.org/10.1080/713654979>

Publikacje składające się na rozprawę doktorską

Artur Ciszewski

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2026

Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens

Veronika Ciszewski,¹ Lukasz Jurek,^{2,*} Agnieszka Marek,³ Krzysztof Michalski,⁴ Zdzisław Gajda,¹ Beata Kaczmarska,⁵ and Anna Rysiek¹

¹Department of Pathobiology and Clinical Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin 20-032, Poland; ²Department of Preventive Infectious and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin 20-036, Poland; ³Department and Clinic of Animal Infectious Diseases, Sub-Department of Infectious Diseases of Farm Animals and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin 20-032, Poland; and ⁴Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin 20-032, Poland

ABSTRACT The aim of the study was to determine the effect of in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the hatchability and selected parameters of the cellular and humoral immune response of chickens. The study was conducted on 1,100 fertilized eggs from commercial broiler breeders (Ross 308; 708). Material for the study consisted of periplasmic fluid and spleens of chicks taken 12 h and 7 d after hatching. The results showed that both combined and single in ovo administration of the multistrain probiotic and zinc glycine chelate significantly increased hatchability of chicks. The flow cytometric study showed that the highest percentage of CD4⁺ T cells, CD4⁺CD25⁺, and high expression of IL12p70 in the serum were obtained in the group supplemented with antibiotic and Zn-Gly both 12 h and 7 d after hatching. In birds supplemented with probiotic and zinc chelate, high percentage of TCD4⁺ cells was found in serum and spleen 12 h after

hatching and in serum after 7 d. The percentage of B-cells, lymphocytes in serum and spleen 12 h and 7 d after hatching was the highest in the group supplemented with probiotic and Zn-Gly. The highest expression of IL12p70 was observed in the group supplemented only with zinc chelate. There were no significant differences in the percentage of CD4⁺ cells in the spleen of birds in the groups receiving the multistrain probiotic at 12 h after hatching, and after 7 d the percentage of CD4⁺ cells was lower in the experimental eggs than in the control group. The percentage of CD8⁺ cells in the serum of birds after hatching was lower in the group supplemented with multistrain probiotic and Zn-Gly than in the control group. In serum, the highest value on 7 d after hatching. The obtained results confirm the strong effect of the combined administration of a multistrain probiotic and Zn-Gly chelate on lymphocyte proliferation and stimulation of cellular immune responses in birds.

Key words: chicken, in ovo, multistrain probiotic, zinc glycine chelate, flow cytometry

2023 Poultry Science 102:1028–23
<https://doi.org/10.1016/j.psc.2023.102823>

INTRODUCTION

Modern poultry rearing and breeding systems are aimed at genetic improvement of production traits, manifested as shorter broiler fattening time, higher weight gains, improved meat quality, and increased productivity of farms through a reduced feed conversion

rate (FCR; Hekki et al., 2022; Olejnik et al., 2022). Obtaining the desired traits in practice often causes harmful disorders and increased susceptibility of birds to disease (Yegorova-Kayev, 2008; Olejnik et al., 2021). These unfavorable phenomena can be counteracted at many stages of the production cycle, including through improvement of the hatchability (Olejnik et al., 2021). One of the critical periods affecting hatchability parameters of a chick is the hatching process (Filak and Hudec, 2001). An overly prolonged hatching period, lasting more than 24–36 h, results in a weak access to water and food in the chicks hatched earlier (Wolzenburg et al., 2010; Liu et al., 2019). In addition, technological procedures, such as stress management

2023 The Author(s). Published by Elsevier Inc. on behalf of Elsevier Science B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 International license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

*Corresponding author: E-mail: l.jurek@ul.lublin.pl

Received July 26, 2023.

Accepted for publication October 10, 2023.

during this period induce stress, which adversely affects the condition of the birds and their potential immunity (Willemsen et al., 2010; Hedlund et al., 2021). Bar Shira et al. (2005) and Taha-Abdelaziz et al. (2018) showed that delayed feeding of chicks inhibits the development of the lymphoid organs, which affects the size of subpopulations of peripheral blood lymphocytes and disturbs the humoral immune response following vaccine administration. The substantial weight loss in chicks during this period, in combination with disturbances in intestinal and muscle development and immune system dysfunction, increases susceptibility to infection by environmental pathogens and thus mortality rates, which affects the farm's economic outcomes (Jha et al., 2019; Wickramasuriya et al., 2023). These negative effects can be limited by obtaining chicks with high health parameters. In this context, particular importance is ascribed to the period of embryonic development. This period has been shown to affect not only the development of the embryo, hatching results, and performance after hatching, but also modulation of the GIT (gastrointestinal tract) microbiota in the early stage of development, mechanisms regulating gene expression, and the development of lymphoid organs and the immune system (Yin et al., 2010; Roto et al., 2016; Dai et al., 2020).

The use of *in ovo* technology to administer bioactive substances during embryonic development, that is, on d 12, 17, or 18 of incubation, alters the embryonic environment and leads to early microbial programming and to *in ovo* feeding (Roto et al., 2016). This affects the development of chicks and their adaptation to environmental conditions in the posthatching period, including the development and maturation of the immune system. In this way, it is possible to administer vaccines, medicines, hormones, or competitive exclusion cultures, such as probiotics, prebiotics, synbiotics, and nutrients, including proteins, amino acids, peptides, carbohydrates, nucleotides, electrolytes, micro- and macroelements, vitamins, L-carnitine, creatine, and plant extracts (Kadam et al., 2013; Hou et al., 2018; Lu et al., 2022). Among these substances, increasing importance is ascribed to probiotics and essential trace elements such as zinc, which stimulate immunity in birds and improve productivity parameters (Kadam et al., 2013; Dunisławska et al., 2017; Hou et al., 2018; Alizadeh et al., 2020).

In ovo administration of probiotics accelerates their interaction with the gut microbiome of the embryo and colonization of the gut with useful bacteria modifying the microbiome and limiting colonization of the gastrointestinal tract by pathogens during the posthatching period (Wilson et al., 2019). Stimulation of the gut microbiome through *in ovo* administration of probiotic microbes plays an important role in the development and regulation of innate and acquired immunity (Clavijo and Flórez, 2018), not only during embryonic development, but also after hatching, when immature gut-associated lymphoid tissue (GALT) undergoes antigenic stimulation by environmental microbes. Reprogramming of the gut microbiome of chickens during early embryonic development can increase their resistance

owing to targeted modulation of cellular and/or humoral immune mechanisms (Shehata et al., 2021). Evidence supporting this hypothesis is provided by the results of experiments showing widely targeted immunomodulatory activity of probiotic microbes in relation to local and systemic lymphoid organs in birds (Alizadeh et al., 2020). Similar studies have also shown that *in ovo* administration of probiotics based on lactic acid bacteria stimulate antibody synthesis in the posthatching period, which suggests beneficial effects of these bacteria on acquired immunity and stimulation of the humoral immune response (Alizadeh et al., 2020).

In addition to probiotics, the normal development, growth, and other vital functions of organisms also depend on intake of macro- and microelements (Savarino et al., 2021). Zinc is an essential trace element that plays an important role in the metabolism of carbohydrates, proteins, lipids and nucleic acids, and also functions as a cofactor of many enzymes (Jarosz et al., 2017). Zinc is needed for cell proliferation and differentiation as well as the growth and development of the body, including the nervous, reproductive, and skeletal systems (Jarosz et al., 2017). The effects of zinc on the immune system of birds are important as well (Hidayat et al., 2020). Zinc is involved in the development of the lymphoid organs, the maturation and differentiation of T lymphocytes, and the functioning of heterophils and mononuclear phagocytes (Jarosz et al., 2017a). In order to reduce zinc deficiencies caused by poor bioavailability this microelement from plant components of feed (Ellis et al., 1982; Fordyce et al., 1987), as well as to reduce environmental pollution associated with excessive excretion of zinc, organic forms of zinc are currently used as an additive to poultry feed (Carter and Kim, 2013). These forms include zinc glycine chelate. This compound is more bioavailable than inorganic forms and also promotes cellular immune mechanisms by regulating the Th1/Th2 immune response and production of pro- and anti-inflammatory cytokines (Jarosz et al., 2017a). Zinc glycine chelates also increase synthesis of class A, M and Y immunoglobulins in poultry, indicating promotion of humoral immunity (Feng et al., 2010) and demonstrating the role of chelates in modulation and regulation of the immune response. In current poultry production systems, stimulation of the growth and development of embryos and chicks as well as enhancement of immunity can be achieved through *in ovo* administration of Zn (Tako et al., 2005). The efficiency of this method of supplying essential trace elements has been confirmed in several experimental studies (Goel et al. 2012; Olatunbosun et al., 2023 ; Kim and Kang 2022), in which administration of organic and inorganic forms of zinc induced stimulation of cellular immunity, expressed as proliferation and differentiation of lymphocytes in organs, and the humoral response, expressed as increased immunoglobulin concentrations.

Despite the beneficial effect of multistrain probiotics and zinc glycine chelates on immunity in poultry, demonstrated in numerous studies, the mechanisms responsible for the effects of these preparations on immune

functions in poultry are not fully known. Moreover, the effect of these compounds on immune system development in terms of programming of chicken embryos has not been determined. The multifaceted impact of multi-strain probiotics and zinc glycine chelates led us to adopt the hypothesis that in ovo administration of a probiotic and chelate in the early embryonic period has immunomodulatory effects and enhances cellular and humoral immune mechanisms, protecting birds against infection in the initial period of life after hatching.

The aim of the study was to determine the effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate and a multistrain probiotic on selected parameters of the cellular and humoral immune response of chicken by assessing the peripheral blood and spleen mononuclear cell in particular the percentage of cells with expression of CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8 α ⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD25⁺, MHC Class II⁺, Bu-1a⁺, CD79A⁺, TCR γ δ ⁺, and monocyte/macrophage (KUL01⁺) molecules.

MATERIAL AND METHODS

Incubation Period

Eggs were collected from a commercial broiler breeder flock (Ross x Ross 708) at 36 wk of age and transported to the Experimental Station of the Poznan University of Life Sciences, Gorzyn 4, Midzychod commune. The eggs were stored at 21°C under commercial conditions for 24 h before weighing and setting. Prior to being placed in the incubator, all eggs were individually weighed and marked, and the eggshells were disinfected with Viron FF (glutaraldehyde, didecyltrimethylammonium chloride, quaternary ammonium compounds and benzyl-C12-C16-alkyldimethyl; DDD-1, Bielsko Biala, Poland) in 1 ml/L solution.

A total of 1,500 eggs were randomly distributed in JARSON Model JD-18 incubators (Gostyn, Poland). Eggs were incubated under standard commercial conditions (T 37.8°C, RH 55%–60%) from 1 to 18 d. On the 19th day of incubation (DOI), the eggs were transferred to a JARSON Model ATLAS-180 hatching chamber.

During the last 3 d of incubation (19–21 DOI), the relative humidity was maintained at 60% to 65%. At 7 and 17 d of incubation, all eggs were candled, and those with cracked shells, infertile eggs, and those containing dead embryos were removed (Ernst et al., 2004).

On embryonic d 17, a total of 1,400 fertilized eggs of similar weight were randomly distributed into 4 treatment groups, with 10 replicates per group and 35 eggs per replicate (350 eggs per group). The following 4 treatment groups were established: eggs injected with sterile 0.9% physiological saline (control group: I); eggs injected with a multistrain probiotic: group II (1×10^5 CFU/egg *Saccharomyces cerevisiae*; 1×10^7 CFU/egg *Lactobacillus casei*; 1×10^7 CFU/egg *Lactobacillus plantarum*); eggs injected with a multistrain probiotic and zinc glycine chelate (Zn-Gly): group III (1×10^5 CFU/egg *S. cerevisiae*; 1×10^7 CFU/egg *L. casei*; 1×10^7 CFU/egg *L. plantarum*; 100 μ g/egg Zn-Gly); and eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly): group IV (100 μ g/egg Zn-Gly) (Table 1).

The multistrain probiotic EM Provet used in the experiment is manufactured by Greenland Technologia EM (Janowiec, Poland). EM Provet was provided by Greenland Technologia EM in powder form. It contains a mixture of live microorganisms, as shown in Table 2. Then EM Provet was diluted in Buffered Saline Solution (PBS) to obtain a solution containing 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, and 1×10^7 CFU *L. plantarum* in 100 μ L of solution. The viability of the probiotic bacterial cells and their content per gram of the product (CFU/g) was tested as described by Weese and Martin (2011). Furthermore, the company manufacturing the EM Provet preparation evaluated

Table 2. EM Provet composition.

	Microbial composition	Strain number	Content per gram of product
1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y200007	5×10^6 CFU/g
2.	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 7469	5×10^8 CFU/g
3.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014	5×10^8 CFU/g

Table 1. In ovo supplementation scheme.

Group	Replicates/number of eggs per replicate N =	In ovo injection—(17 DOI)		Volume and solution of bioactive compounds injected in ovo
		Amount of multistrain probiotic in 100 μ L	Amount of zinc glycine chelate (Zn-Gly) in 100 μ L	
I—control group	10/35 350	non-injected	non-injected	500 μ L 0.9% NaCl
II	10/35 350	1×10^5 CFU/eggs <i>S. cerevisiae</i> 1×10^7 CFU/eggs <i>L. casei</i> 1×10^7 CFU/eggs <i>L. plantarum</i>	-	100 μ L multistrain probiotic + 400 μ L MQ water
III	10/35 350	1×10^5 CFU/eggs <i>S. cerevisiae</i> 1×10^7 CFU/eggs <i>L. casei</i> 1×10^7 CFU/eggs <i>L. plantarum</i>	100 μ g Zn-Gly/100 μ L MQ water/eggs	100 μ L multistrain probiotic + 100 μ L Zn-Gly + 300 μ L MQ water
IV	10/35 350	-	100 μ g Zn-Gly/100 μ L MQ water/eggs	100 μ L Zn-Gly + 400 μ L MQ water

Abbreviations: DOI, days of incubation; MQ, milli Q water; N, number of eggs in all replicates.

the viability of the probiotic bacterial cells and their content per gram of the product in their laboratory, thus guaranteeing that the product used in the experiment meets all quality criteria for products containing live bacterial cultures.

The Zn glycine chelate used in the experiment is manufactured by ARKOP Sp. z o.o. The Zn-Gly powder contains 250 mg Zn-Gly per g of product. The powder was dissolved in deionized water to obtain solutions containing 100 µg Zn-Gly/100 µL MQ water.

In Ovo Inoculations

At 17 DOI, the eggs in each group received an equal volume (500 µL) of 0.9% physiological saline or a bioactive compound, injected in ovo into the amniotic sac (Table 1). Before injection, all eggs were sterilized by spraying with 75% ethanol. Additionally, the instruments were autoclaved before use. Embryonated eggs were injected through the air cell with a blunt tip injector needle (1.27 mm bore width) to target the amnion. Next, 0.5 mL of the solution was injected into each amniotic cavity using a 23-gauge 2.5-cm needle. Following injection, the pinhole sites in the eggs were immediately sealed with sterile paraffin, after which the eggs were returned to the incubator. The in ovo injection procedure was completed within 30 min. All methods are described in detail by Alizadeh et al. (2020).

Birds and Housing

After hatching, all birds in each group were sexed, and 150 one-day-old female chickens from each group were selected at random for analyses. Each treatment group had 10 replicates with 15 birds per replicate. The rearing period was 7 d. The birds were fed a basal diet with no bioactive compounds, coccidiostats, or antibiotics. Birds received compound feed appropriate for the initial rearing period, that is, starter feed, S (d 1–21), which was provided to the chickens in crumble form. Food and water were available ad libitum. The basal diet was formulated to meet the dietary recommendations for Ross 308 broiler chickens (Aviagen, Broiler Ross Nutrition Supplement). The nutrient content of the diets was calculated on the basis of the chemical composition of the raw feedstuffs and metabolizable energy value. The composition of the basal diet is presented in Table 3.

The experimental birds were housed under uniform, controlled environmental conditions, and in accordance with the recommendations for this line. Chickens were reared in pens on wood shavings in a room with controlled temperature and humidity. The pens were equipped with feeding lines and nipple drinkers. The lighting regime was adjusted to the age and diurnal rhythm of the birds. The light intensity was 30 to 40 lux up to d 7, the temperature was maintained at 31°C to 33°C up to d 7, and relative humidity was 60% ± 10%.

Table 3. Composition and nutrient value of basal diet (%).

	Percentage %
Component	Starter (d 1–21)
Wheat (group I, VI)	35.02
Soybean meal	34.02
Maize	22.54
Rapeseed oil	2.01
Lard	2.00
Rapeseed meal	1.00
Premix without coccidiostat ¹	1.00
Monocalcium phosphate	0.72
Calcium carbonate	0.62
L-Methionine	0.30
L-Lysine	0.22
Sodium chloride	0.20
NaHCO ₃	0.12
Threonine	0.12
L-valine	0.12
Optiphos (0.01%) ²	0.01
AMEN	12.47
Crude protein	22.7
Crude fat	6.02
P available	0.48
Ca	0.96
Na	0.16
Cl	0.16
Lys dig.	1.25
Met dig.	0.6
Thr dig.	0.84
Val dig.	0.94

¹Vitamin–mineral premix provided per kg diet: Mn, 55 mg; Zn, 50 mg; Fe, 80 mg; Cu, 5 mg; Se, 0.1 mg; I, 0.36 mg; Na, 1.6 g, retinol, 2.48 mg; cholecalciferol, 25 µg; DL-α-tocopherol, 60 mg; cyanocobalamin, 0.012 mg; menadione sodium bisulfite, 1.1 mg; niacin, 53 mg; choline chloride, 1020 mg; folic acid, 0.75 mg; biotin, 0.25 mg; riboflavin, 5.5 mg; xylanase (Econase HCP 4000; AB Vista, Marlborough, UK), 4mg.

²Optiphos - 6-phytase derived from *Escherichia coli*.

Growth Performance in Chickens

On hatch day, the hatchability percentage was recorded using the following formula: hatchability percentage = (number of chicks hatched on d 21/number of eggs fed in ovo) × 100 (Table 4).

During the experiment, the birds were weighed before feeding on d 0 (12 h after hatch) and 7. Average body weight gains (BWG) were calculated for the initial rearing period: 0 to 7 d of life. In addition, feed intake (FI) and FCR were recorded on a per-pen basis on d 0 and 7 and calculated for the initial rearing period (d 0–7). Feed conversion ratio was calculated using BWG and FI and adjusted for mortality. Chicken mortality was recorded daily during morning and afternoon inspection

Table 4. Effects of in ovo injection on hatchability.

Group	Hatchability, % (n)
I—control group	95.4% (334) ^a
II	90.8% (318) ^b
III	83.4% (292) ^c
IV	86.2% (302) ^b

n: number of hatching chicks; I: control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline; group II: eggs injected with a multistrain probiotic; group III: eggs injected with a multistrain probiotic and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV: eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). a, b, c, d - statistical differences ($p \leq 0.05$).

Table 5. Growth performance in chickens.

Group	BWG 0–7	FI 0–7	FCR 0–7
I	130 ^{ab}	161 ^a	1.24 ^a
II	127 ^b	146 ^c	1.15 ^{bc}
III	135 ^a	152 ^{ab}	1.13 ^c
IV	131 ^{ab}	156 ^{ab}	1.19 ^{ab}
SEM	0.892	1.269	0.01
<i>P</i> value	0.0058	<0.001	<0.001

Abbreviations: BWG, body weight gain; FCR, feed conversion ratio; FI, feed intake; SEM, standard error of the mean.

^{a, b, c}: statistical differences; 0–7: days of life; I: control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline; group II: eggs injected with a multistrain probiotic; group III: eggs injected with a multistrain probiotic and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV: eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly).

throughout the trial. Feed intake and FCR were corrected for mortality accordingly (Table 5).

Blood Samples and Separation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

The materials for analysis by flow cytometry were samples of peripheral blood collected 12 h after hatching from chicks killed by decapitation and from the wing vein on 7 d after hatching. The blood samples were collected in sterile vacuum tubes containing heparin as an anticoagulant (Vacuette, Medlab Products, Raszyn, Poland). Blood samples were collected 12 h after hatching, before the chicks were given feed and water, and at 7 d of age. Blood was sampled from 3 birds from each replicate (30 samples in total) in each experimental group. Blood samples were not pooled. The samples were transported to the laboratory at +4°C to 8°C within 1 h.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from the blood using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Sp. z.o.o., Poznań, Poland) according to the manufacturer's instructions. Briefly, at room temperature, 5 mL aliquots of Histopaque-1077 were overlaid with the blood and centrifuged for 30 min at 400 × *g*. Following centrifugation, the opaque interface was collected and washed twice at 4°C with phosphate-buffered saline containing 0.2% Bovine Serum Albumin and 0.2% sodium azide before centrifuging for 10 min at 250 × *g* at 4°C. Cell numbers were calculated and the cell concentrations adjusted to 1 × 10⁶ cells/mL for indirect fluorescent antibody labeling. Cell viability was consistently greater than 95% according to the trypan blue dye exclusion method.

Determination of Cellular and Humoral Immune Response Parameters

Flow cytometry was used to determine selected cellular and humoral immune response parameters. Samples of blood and spleen from chickens were tested in a BD FACSVerse flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Brea, NJ). From 10,000 to 30,000 events were

collected in each measurement by flow cytometer. Electronic compensation was used to eliminate residual spectral overlaps between individual fluorochromes. Flow cytometry was repeated 3 times for each sample and compared for repeatability. The results were analyzed using XL SYSTEM II v.3.0 software and FCS 2.0 format to obtain data in the form of histograms.

Antibodies

Fluorochrome-labeled monoclonal antibodies for the surface molecules of chicken lymphocytes were used for the cytometric tests (Table 6). One-step cell labeling was used for the following antibodies: CD3:FITC, CD25:FITC, CD4:RPE or CD4:FITC, CD8α:RPE, CD79A:FITC, MHC Class II Monomorphic:FITC, and Bu-1a:RPE. For flow cytometric analysis using monoclonal antibodies, 100 μL of the separated PBMC from each sample was used. First, 10 μL of the monoclonal antibody was added to 100 μL of the separated PBMC. After thorough mixing with a vortex mixer, the samples were incubated for 30 min in the dark at room temperature (25°C). Next, the cell suspension was rinsed 3 times with PBS solution, of which 500 μL was added to each sample. The sample was centrifuged after each washing at 1,500 rpm for 5 min. Following the final centrifuging and decanting of the supernatant, 500 μL of PBS was added to the resulting cell pellet, and after thorough mixing, the mixture was left for 10 min at room temperature. The prepared samples were used for flow cytometric analysis. A 2-step cell labeling method was used for TCRγδ⁺ and monocyte/macrophage (KUL01⁺). First, 10 μL of the antibody was added to 100 μL of the separated PBMC. After thorough mixing with a vortex mixer, the samples were incubated for 30 min in the dark at room temperature (25°C). Next, the cell suspension was rinsed 3 times with PBS solution, of which 500 μL was added to each sample. The sample was centrifuged after each washing at 1,500 rpm for 5 min. Then 10 μL of polyclonal secondary antibodies (Rabbit F(ab')₂ anti-Mouse IgG:FITC or Goat anti-Mouse IgG (H/L):FITC) were added to the samples, and after thorough mixing, the samples were incubated at room temperature (18°C–25°C) for 30 min. The final procedure for preparing the samples for cytometric tests was similar to the procedure for one-step cell labeling. An analogous procedure was used for control samples prepared using isotype antibodies. In each blood sample, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8α⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD25⁺, MHC Class II⁺, Bu-1a⁺, CD79A⁺, TCRγδ⁺, and monocyte/macrophage (KUL01⁺) were determined separately. Immunophenotyping was described in detail by Fair et al. (2008) and Jarosz et al. (2017a).

Spleen Mononuclear Cell Preparation and Flow Cytometry Analysis

At 12 h after hatching, 3 spleen samples were taken from each replicate, both in the experimental and

Table 6. Antibodies used for flow cytometry in the study.

Marker	Clone	Isotype	Conjugate	Target cells
CD3	CD3-12	Rat IgG1	FITC	T cells
CD4	2-35	Mouse IgG2b	FITC and RPE	CD4 ⁺ T cells
CD8 α	11-39	Mouse IgG1	RPE	CD8 ⁺ T cells
CD25	AbD13504	HuCAL Fab-dHLX-MH bivalent	FITC	activated T-lymphocytes
MHC Class II	21-1A6	Mouse IgG1	FITC	Antigen-presenting cells (dendritic cells, macrophages, and B cells)
TCR $\gamma\delta$	TCR-1	Mouse IgG1	Secondary antibodies - Rabbit F(ab') ₂ anti-Mouse IgG: FITC	$\gamma\delta$ T cells
Bu-1a	L22	Mouse IgG1	FITC	B cells
Human CD79A (cross-reactivity)	HM57	Mouse IgG1	FITC	B lymphocytes during differentiation
Monocyte/ macrophage	KUL01	Mouse IgG1	Secondary antibodies - Goat anti-Mouse IgG (H/L):FITC	Monocytes and macrophages

Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; RPE, phycoerythrin.

control groups. A total of 120 spleen samples were collected for immunological tests 12 h after hatching (30 spleen samples: group I, 30 spleen samples: group II, 30 spleen samples: group III, and 30 spleen samples: group IV). The same number of spleen samples was collected on the seventh day after hatching. Spleen samples were not pooled. Spleen samples were rinsed 3 times in Hank's Balanced Salt Solution and filtered through a 40- μ m nylon cell strainer using the flat end of a 1 mL syringe plunger. Cells were resuspended in 5 mL RPMI (Invitrogen, Burlington, Canada) containing 10% fetal bovine serum, 2.5% HEPES (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY), 0.5% Gentamicin (Gibco, Grand Island, NY), and 0.05% 2-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, St Louis, MO), and overlaid on 4 mL Histopaque-1077 (Sigma, Oakville, Canada) for density gradient separation. Mononuclear cells at the interface were harvested and washed twice in RPMI (Gibco, Grand Island, NY) media. Cell numbers were calculated and the cell concentrations adjusted to 1×10^6 cells/mL for fluorescent antibody labeling. Cell viability was consistently greater than 95% according to the trypan blue dye exclusion method. The analysis was described in detail by Alizadeh et al. (2020). In each spleen mononuclear cell sample, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8 α ⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD25⁺, MHC Class II⁺, Bu-1a⁺, CD79A⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, and monocyte/macrophage (KUL01⁺) were determined separately using a BD FACSVerse flow cytometer.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed using Statistica 13.2 PL software (StatSoft, Krakow, Poland). The distribution of data was analyzed by the Shapiro–Wilk test, and the results were expressed as arithmetic mean and standard deviation. Due to the lack of normal distribution, nonparametric tests of significance of differences were used for $P < 0.05$. Kruskal nonparametric analysis of variance (ANOVA) on

ranks and post-hoc tests for independent samples were used to evaluate the cellular and humoral parameters of the immune response between the control group (I) and experimental groups (II–IV) on individual days (12 h, 7 d). The effect of sampling period (grouping variable) on the immune response was analyzed using the Mann–Whitney U test. The results are presented in graphic form (Figures 1–6), with the same lowercase letters indicating a lack of statistically significant differences for groups I to IV, and capital letters indicating comparisons in time. The following designations were used for individual variables (experimental samples): I: control group, II: +multistrain probiotic, III: +multistrain probiotic + zinc glycine chelate (Zn-Gly), and IV: + zinc glycine chelate (Zn-Gly).

The statistical evaluation of performance results was carried out using SAS v. 9.4 statistics software (SAS, 2011). All data were presented as mean values with pooled standard error of the mean (SE). Two-way ANOVA was used to determine the effect of the experimental factors. For all characteristics, the significance of differences between group mean values was verified by Tukey's test.

RESULTS

Effect of In Ovo Injection on Hatchability of Broiler Chickens

In all experimental groups, the hatchability percentage was lower than that observed in the control group. The lowest hatchability percentage was observed in group III (83.4%). The smallest difference in hatchability percentage compared to the control group was observed in group II (90.8%, Table 4).

Growth Performance of Broiler Chickens

No statistically significant differences in BWG were observed between the control group and the

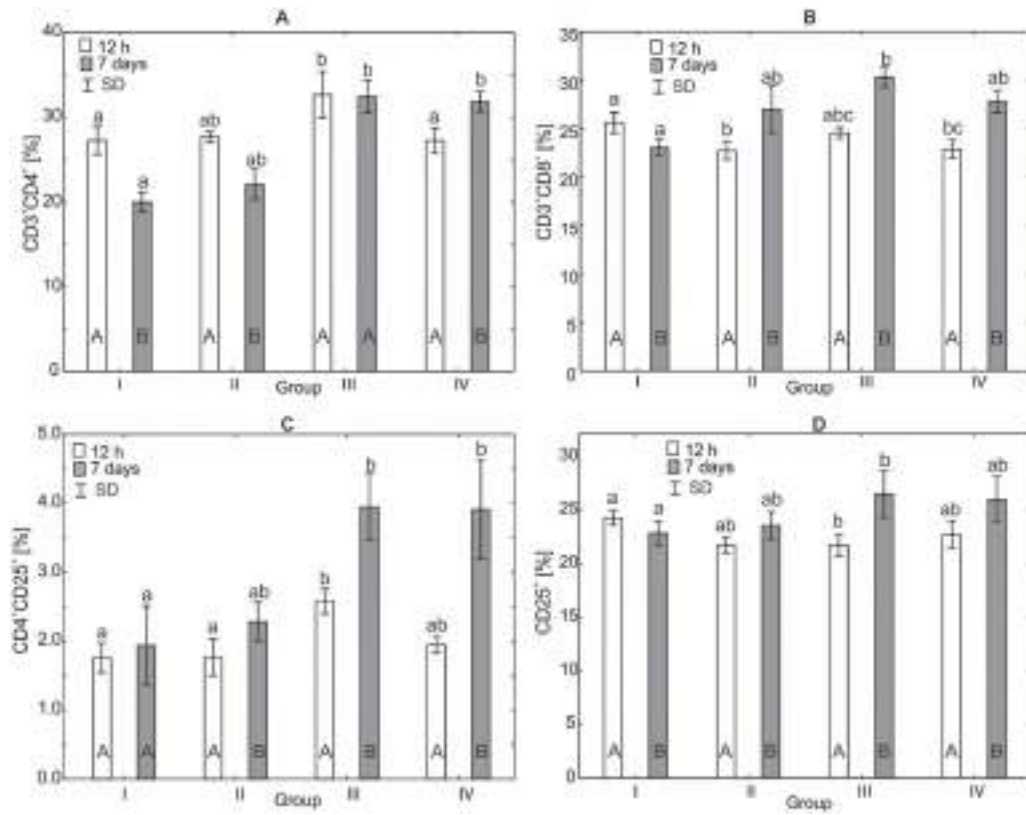


Figure 1. One-way ANOVA and Mann–Whitney U test for CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CD25⁺ percentage in the peripheral blood of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 d of age. Statistical differences ($P \leq 0.05$) are marked with different letters. I: control group, II–IV: experimental groups. Abbreviation: SD, standard deviation.

supplemented group during the first 7 d of the experiment. A statistically significant difference in BWG was noted between groups II and III of experimental chickens. Statistically significant differences in FI were

observed between the control group and group II, and between group II and other experimental groups. Statistically significant differences in FCR were observed between the control group and experimental groups II

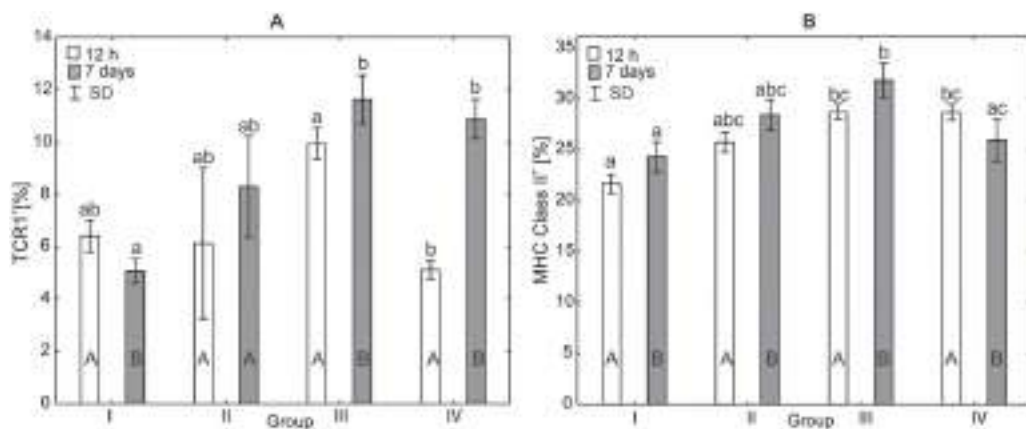


Figure 2. One-way ANOVA and Mann–Whitney U test for Bu-1a⁺, CD79A⁺, monocyte/macrophage (KUL01⁺) percentage in the peripheral blood of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 d of age. Statistical differences ($P \leq 0.05$) are marked with different letters. I: control group, II–IV: experimental groups. Abbreviation: SD, standard deviation.

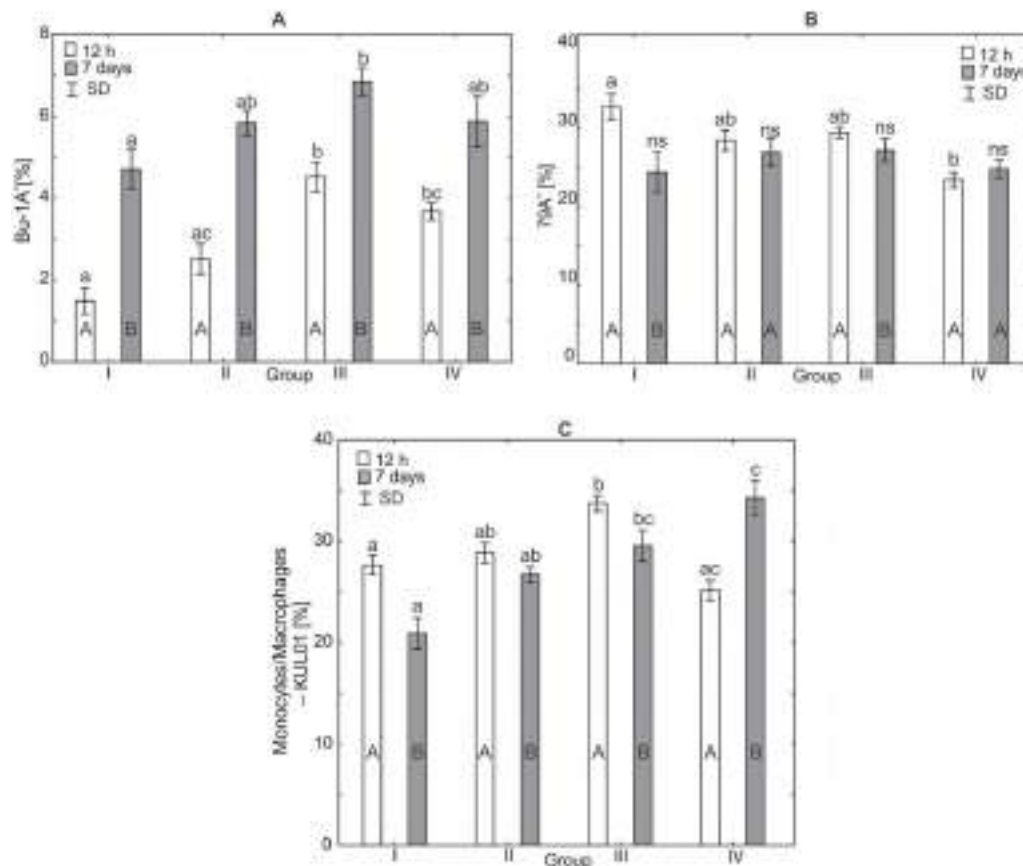


Figure 3. One-way ANOVA and Mann–Whitney U test for TCR $\gamma\delta^+$ and MHC Class II $^+$ percentage in the peripheral blood of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 d of age. Statistical differences ($P \leq 0.05$) are marked with different letters. I: control group, II–IV: experimental groups. Abbreviation: SD, standard deviation.

and III, and between group IV and group III. There was no statistically significant difference in FCR between the control group and group IV (Table 5).

Analysis of the Percentage of CD3 $^+$ CD4 $^+$, CD3 $^+$ CD8 $^+$, CD4 $^+$ CD25 $^+$, and CD25 $^+$ in the Serum of Broiler Chickens

After 12 h of the experiment, the percentage of CD3 $^+$ CD4 $^+$ in group III ($H = 13.58$, $P < 0.0035$) was statistically significantly different from that observed in the experimental group IV and in the control group. After 7 d of the experiment, the percentages of CD3 $^+$ CD4 $^+$ in experimental groups III and IV were statistically significantly higher than in the control group ($H = 18.30$, $P < 0.0004$). Within-group comparisons with the Mann–Whitney U test indicated that the time of the experiment was a factor influencing the results, with statistically significant differences demonstrated in all study groups except group III (Figure 1).

Analysis of the percentage of CD3 $^+$ CD8 $^+$ after 12 h of the experiment showed statistically significant

differences ($H = 17.16$, $P < 0.0007$) between the control group, and groups II and IV. There were no statistically significant differences in the percentages of CD3 $^+$ CD8 $^+$ between the control group and group III. After 7 d of the study, statistically significant difference was observed in the percentage of CD3 $^+$ CD8 $^+$ between the control group and group III, but there were no statistically significant differences observed in groups II and IV and the control group (Figure 1).

The percentage of CD4 $^+$ CD25 $^+$ after 12 h of the experiment in the control group ($H = 15.21$, $P < 0.0016$) was statistically significantly lower than in group III, but not statistically different from the percentages obtained in groups II and IV. After 7 d of the study, statistically significantly higher percentages of CD4 $^+$ CD25 $^+$ ($H = 17.97$, $P < 0.0004$) were observed in groups III and IV compared to the control group. There were no statistically significant differences in CD4 $^+$ CD25 $^+$ percentages between group II and the control group. Within-group comparisons over time showed statistically significant differences in the percentages of CD4 $^+$ CD25 $^+$ in all experimental groups except the control group (Figure 1).

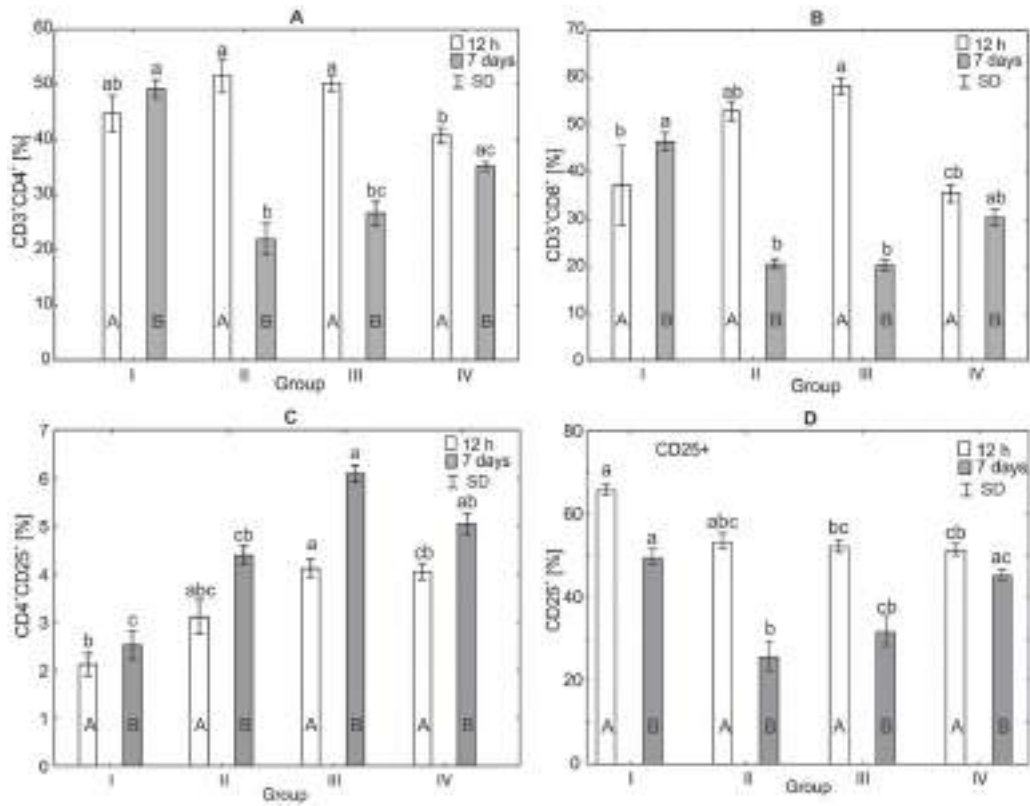


Figure 4. One-way ANOVA and Mann–Whitney U test for CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CD25⁺ percentage in the spleen mononuclear cell of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 d of age. Statistical differences ($P \leq 0.05$) are marked with different letters. I: control group, II–IV: experimental groups. Abbreviation: SD, standard deviation.

After 12 h of the experiment, statistically significantly difference in the percentage of CD25⁺ was observed between the control group and group III ($H = 13.80$, $P < 0.0032$). There were no statistically significant

differences in CD25⁺ percentages between the control group and the other experimental groups. Similarly, after 7 d of the experiment, a statistically significantly difference in the percentage of CD25⁺ was observed

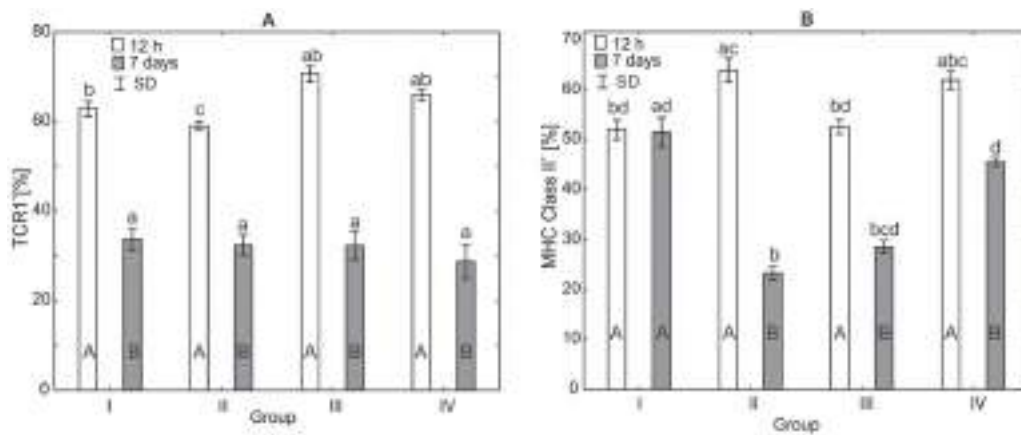


Figure 5. One-way ANOVA and Mann–Whitney U test for Bu-1a⁺, CD79A⁺, monocyte/macrophage (KUL01⁺) percentage in the spleen mononuclear cell of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 d of age. Statistical differences ($P \leq 0.05$) are marked with different letters. I: control group, II–IV: experimental groups. Abbreviation: SD, standard deviation.

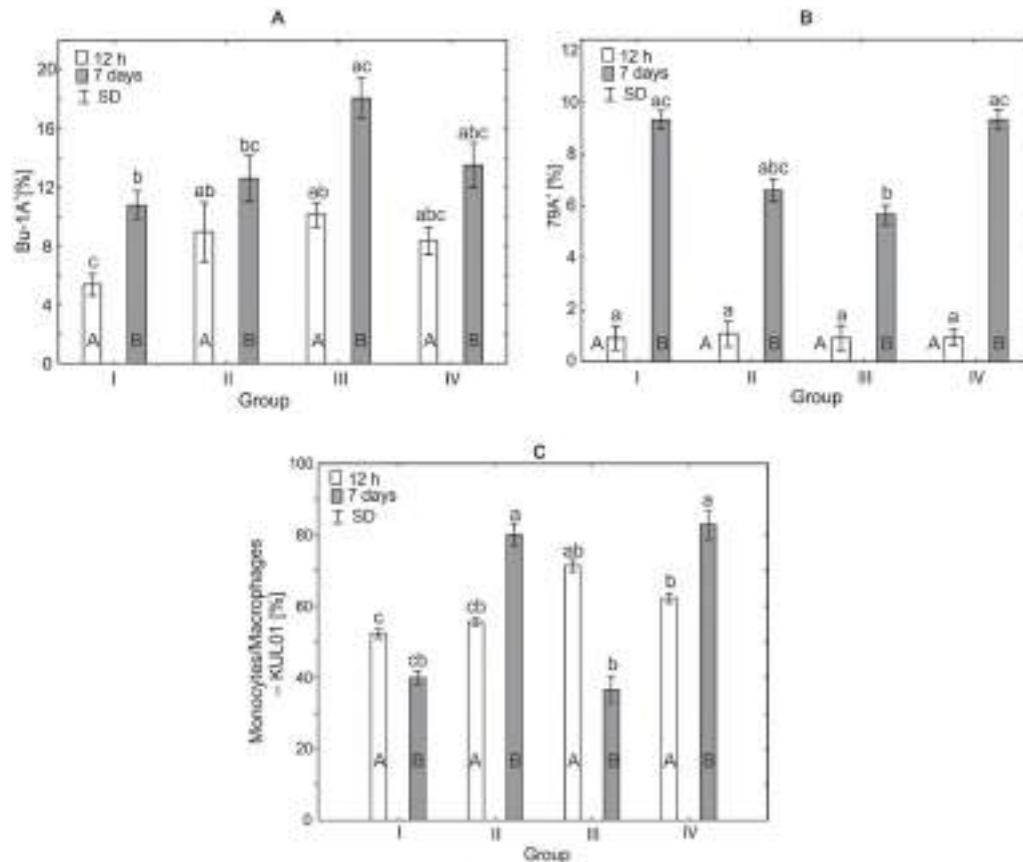


Figure 6. One-way ANOVA and Mann–Whitney U test for $\text{TCR}\gamma\delta^+$ and MHC Class II^+ percentage in the spleen mononuclear cell of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 d of age. Statistical differences ($P \leq 0.05$) are marked with different letters. I: control group, II–IV: experimental groups. Abbreviation: SD, standard deviation.

between the control group and group III. Within-group comparisons over time showed statistically significant differences in all study groups (Figure 1).

Analysis of the Percentage of $\text{TCR}\gamma\delta^+$ and MHC Class II^+ in the Serum of Broiler Chickens

After 12 h of the experiment, statistically significant differences ($H = 15.62$, $P < 0.014$) in the percentages of $\text{TCR}\gamma\delta^+$ were observed between groups III and IV. The $\text{TCR}\gamma\delta^+$ percentages in the control group and group II did not differ statistically significantly from those observed in the other groups. After 7 d of the experiment, it was observed that the percentage of $\text{TCR}\gamma\delta^+$ in the control group was statistically significantly different compared to groups III and IV ($H = 18.12$, $P < 0.004$). Within-group comparisons over time showed statistically significant differences in all study groups except group II (Figure 2).

After 12 h of the experiment, statistically significant differences in the percentage of MHC Class II^+

($H = 19.45$, $P < 0.0002$) were observed in groups III and IV compared to the control group. There were no statistically significant differences in the percentage of MHC Class II^+ between group II and the control group. After 7 d of the experiment, a statistically significant difference in the percentage of MHC class II^+ was observed between the control group and group III. There was also a statistically significant difference in the percentage of MHC class II^+ between groups III and IV. Within-group comparisons over time showed statistically significant differences in all experimental groups and in the control group (Figure 2).

Analysis of the Percentage of Bu-1A^+ , CD79A^+ , and Monocytes/Monophages— KUL01^+ in the Serum of Broiler Chickens

After 12 h of the experiment, statistically significant differences were observed in the mean percentage of Bu-1A^+ between the control group and groups III and IV ($P < 0.0001$), but there were no statistically significant differences between the percentages of Bu-1A^+ observed

in the control group and group II. After 7 d of the experiment, a statistically significant difference in the percentage of Bu-1A⁺ was observed between the control group and group III ($H = 18.41$, $P < 0.0004$). Within-group comparison over time showed statistically significant differences in all groups (Figure 3).

After 12 h of the study, a statistically significant difference in the percentage of CD79A⁺ was observed between the control group and the group IV ($H = 19.57$, $P < 0.0002$). There were no statistically significant differences in the percentages of CD79A⁺ between the control group and the other experimental groups. After 7 d of the experiment, the percentages of CD79A⁺ did not differ statistically significantly ($H = 8.40$, $P < 0.038$) in any of the experimental groups compared to the control group. Within-group comparison over time showed statistically significant differences in groups I and III, and no differences in groups II and IV (Figures 3 and 7).

After 12 h of the experiment, the average percentage of KUL01⁺ monocytes/macrophages in group III (33.73%) was statistically significantly different from that observed in the control group ($H = 20.22$, $P < 0.0002$). A statistically significant difference in the percentage of monocytes/macrophages-KUL01⁺ was also observed between groups III and IV. After 7 d of the study, the percentages of monocytes/macrophages-KUL01⁺ in groups III and IV (29.55% and 25.16%, respectively) were statistically significantly different ($H = 21.13$, $P < 0.0001$) from that observed in the control group. Within-group comparisons over time showed statistically significant differences across all study groups (Figure 3).

Analysis of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, and CD25⁺ Percentages in the Spleen of Broiler Chickens

After 12 h of the experiment, no statistically significant differences in CD3⁺CD4⁺ values were observed between the control group and the experimental groups. However, the value of CD3⁺CD4⁺ in group IV ($H = 17.55$, $P < 0.0005$) after 12 h of the experiment was statistically significantly different compared to the values observed in groups II and III. After 7 d of the study, the CD3⁺CD4⁺ values in groups II and III showed statistically significant differences compared to the value observed in the control group ($H = 20.57$, $P < 0.0001$). No statistically significant differences in CD3⁺CD4⁺ values were observed between the control group and the group IV. Comparison of the experimental groups by the Mann–Whitney U test indicated that the time of the experiment was an important factor influencing the results. Statistically significant differences in CD3⁺CD4⁺ values were observed in all groups (Figure 4).

Analysis of the level of CD3⁺CD8⁺ showed statistically significant differences after 12 h of the experiment between group III, ($H = 15.26$, $P < 0.0016$), and groups IV and I (control). CD3⁺CD8⁺ values in the control group (I) did not differ statistically significantly from

the values obtained in groups II and IV. After 7 d of the experiment, the value of CD3⁺CD8⁺ in group I was statistically significantly different ($H = 20.51$, $P < 0.0001$) compared to groups II and III. No statistically significant differences in CD3⁺CD8⁺ values were observed between groups I and IV (Figure 4).

The analysis of the impact of CD4⁺CD25⁺ on the spleen after 12 h of the experiment showed that the value in the control group was statistically significantly different ($H = 19.55$, $P < 0.0002$) from the value observed in group III and did not differ statistically significantly from the observed in groups II and IV. After 7 d of the experiment, statistically significant differences in CD4⁺CD25⁺ values were observed between the control group and groups III and IV (Figure 4).

The level of CD25⁺ after 12 h of the experiment in the control group (I) was statistically significantly different from the levels in groups III and IV ($H = 15.26$, $P < 0.0016$). There were no statistically significant differences in the level of CD25⁺ in the control group compared to group II. After 7 d of the experiment, statistically significant differences ($H = 20.51$, $P < 0.001$) in CD25⁺ levels were observed between the control group (I), and groups II and III (Figure 4).

Analysis of the Percentage of TCR $\gamma\delta$ ⁺ and MHC Class II⁺ in the Spleen of Broiler Chickens

After 12 h of the experiment, statistically significant differences ($H = 21.05$, $P < 0.001$) in the percentage of TCR $\gamma\delta$ ⁺ were observed between groups I and II. The percentage of TCR $\gamma\delta$ ⁺ after 7 d of the experiment in all supplemented groups remained at the same level and did not show statistically significant differences compared to the control group ($H = 6.45$, $P < 0.09$, Figure 5).

After 12 h of the experiment, statistically significant differences ($H = 17.99$, $P < 0.0004$) was observed in the percentages of MHC Class II⁺ in group II compared to the control group. In groups III and IV, there were no statistically significant differences in the percentage of MHC Class II⁺ compared to the control group. Similar differences were observed after 7 d of the experiment ($H = 21.60$, $P < 0.0001$, Figure 5).

Analysis of the Percentage of Bu-1A⁺, CD79A⁺, and Monocytes/Monophages—KUL01⁺ in the Spleen of Broiler Chickens

After 12 h of the experiment, statistically significant differences were observed in the mean percentage of Bu-1A⁺ between the control group ($H = 15.71$, $P < 0.0013$) and experimental groups II and III (8.95% and 10.13%, respectively). After 7 d of the experiment, a statistically significant difference in the percentage of Bu-1A⁺ was observed between the control group ($H = 17.55$, $P < 0.0005$) and group III. The percentage of Bu-1A⁺ in the remaining experimental groups was not statistically significantly different from the control group (Figure 6).

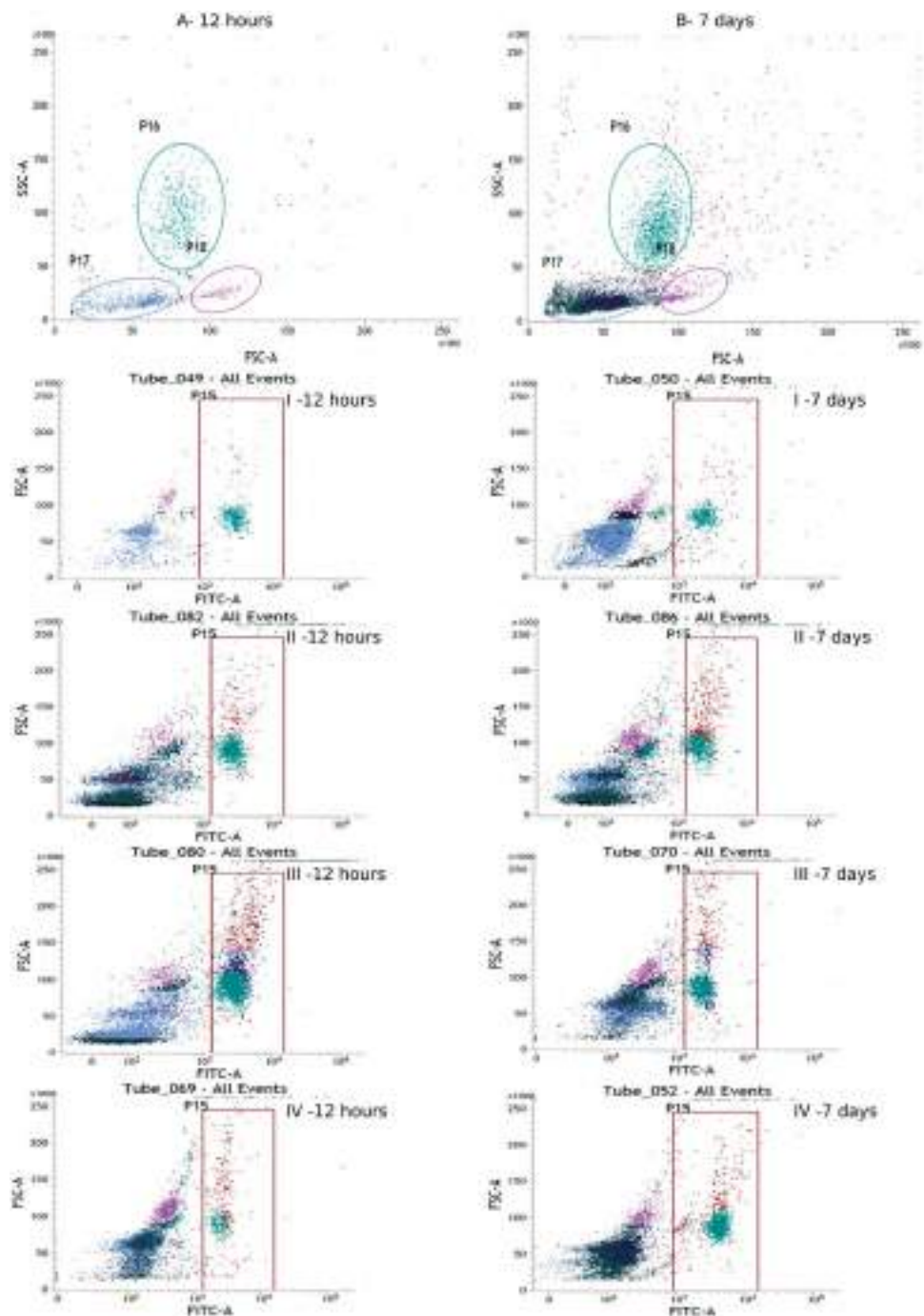


Figure 7. Flow cytometric analysis of CD79A⁺ in blood of chickens (dot plots). (A) Chicken white blood cells 12 h after hatching, (B) chicken white blood cells at 7 d of age, lymphocytes (P17), monocytes (P18), heterophils (P16). I: control group—blood from chickens that hatched from eggs injected with sterile 0.9% physiological saline; group II—blood from chickens that hatched from eggs injected with a multistrain probiotic; group III—blood from chickens that hatched from eggs injected with a multistrain probiotic and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—blood from chickens that hatched from eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly), P15—gate containing cells with expression CD79A⁺ labeled with FITC (fluorescein isothiocyanate). Abbreviation: FSC, forward scatter.

After 12 h of the experiment, the mean percentages of CD79A⁺ in the experimental groups did not differ statistically significantly ($H = 0.33$, $P < 0.95$) from the control group. After 7 d of the study, the percentage of CD79A⁺ in the control group was statistically significantly different ($H = 20.51$, $P < 0.0001$), compared to group III (5.67%; Figure 6).

After 12 h of the experiment, the percentages of monocytes/macrophages-KUL01⁺ in groups III and IV (71.33% and 62.20%, respectively), differed statistically significantly from the percentage in the control group ($H = 21.60$, $P < 0.0001$). After 7 d of the experiment, the percentage of monocytes/macrophages-KUL01⁺ in groups II and IV (88.0% and 82.85%, respectively), differed statistically significantly ($H = 18.69$, $P < 0.0003$), from the values observed in the groups I and III (Figure 6).

DISCUSSION

In commercial broiler production, the period from the 18th day of incubation to 4 to 7 d after hatching is critical for the survival and further development of chicks (Ferket, 2006). In ovo administration of probiotics and microelements during this period stimulates the development of individual systems and organs, especially the immune system, thereby reducing morbidity and mortality rates among chicks (Cox and Dalloul, 2015). The results of the study, aimed at evaluating the immune status of chicks in the initial period after hatching following in ovo administration of a multistrain probiotic and zinc glycine chelate, shed new light on mechanisms of immune system modulation induced by the use of feed additives, indicating that they can be used to reduce prophylactic administration of medicine to chicks in the initial rearing period.

Adequate hatchability of chicken eggs is crucial for the economic functioning of the poultry farm, particularly its production results (de Oliveira et al., 2014). The experiment showed that the combined in ovo administration of a multistrain probiotic and zinc glycine chelate (group III) significantly reduced hatching rates. Similarly, in ovo administration of the individual supplements, that is, the multistrain probiotic (group II) or zinc glycine chelate (group IV), also reduced hatchability, but no statistically significant differences were shown between groups. The results are consistent with those published by Meijerhof and Hulet (1997), Hashemzadeh et al. (2010), Hosseini-Mansoub et al. (2011), and Yamawaki et al. (2013), who reported that in ovo application of certain probiotic bacteria reduces hatchability. Contrasting results were published by Pender et al. (2017), who observed no changes in chick hatching rates between the experimental and control groups following in ovo administration of Primolac W/S, containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus faecium*, and *Bifidobacterium bifidum*. This effect of the formulation seems to be due in part to the types of probiotic bacteria included in it and the level of the supplement applied.

Similar observations pertain to zinc, which is commonly considered to be a nontoxic element for people and animals, although its exact mechanism of action on the body is not fully known (Roohani et al., 2013). Although our study showed lower hatching rates following in ovo administration of zinc glycine chelate alone or in combination with the multistrain probiotic, previously published results showed no negative influence of in ovo administration of Zn on the developing chicken embryo (Tako et al., 2005; Goel et al., 2012; Oliveira et al., 2015). It is likely that the effect of zinc on the embryo was in this case dependent on the dose of zinc as well as its chemical form and bioavailability. Higher levels of zinc have been shown to increase embryo mortality and reduce hatching rates (Oliveira et al., 2015; Sun et al., 2018). Similarly, zinc in organic form, with its greater bioavailability, may have toxic effects, causing damage to embryos (Star et al., 2012; Swain et al., 2016). The reduction of hatchability to the level of 86% was shown by Yair et al. (2013), after in ovo administration of 0.6 mg zinc/egg in the form of bioplex zinc along with other minerals and vitamins. Also Joshua et al. (2016), after in ovo administration of various doses nano zinc (20–80 $\mu\text{g}/\text{egg}$), showed a reduction in hatchability compared to the control group, which was at the level of 96% to 88%. Despite lower hatchability, Joshua, et al. (2016) did not observe differences in body weight of hatched chicks. Similar results were obtained in the presented study (Table 5). Tako et al. (2005) observed that in ovo administration of 0.5 mg zinc chelates on 17 d of embryo incubation may result in increased biochemical activity of the brush-border enzymes and transporters, and increased the jejunal villus surface area, thereby enhancing the intestinal development. It can be assumed that the lower hatchability rates will be compensated by the beneficial effects of zinc compounds on the chicks after hatching. It should be emphasized that despite the obtained reduction in hatchability after the combined administration of in ovo multistrain probiotics and zinc glycine chelate (group III), and in ovo supplementation with zinc glycine chelate (group IV), we showed an increase in the process of proliferation and differentiation of TCD3⁺CD4⁺ and TCD3⁺CD8⁺ lymphocytes, and stimulation of cellular immune response mechanisms. This is extremely important in the first period of chicks' life because they are exposed to numerous environmental bacterial and viral infections. The functional mobilization of the immune system demonstrated in the study will have a positive (upregulated) effect on the antigen presentation during the induction of the immune response. On the one hand, this will protect the chick against infection and death, and on the other hand, it will modulate the pro- and anti-inflammatory response and maintain the balance between Th1 and Th2. The organic form of zinc used in the present study, that is, glycine chelate, is better absorbed and assimilated than inorganic forms, which may have increased the zinc concentration in the yolk sac and reduced hatching rates. The initial content of zinc in the yolks of hatching eggs has been shown to vary depending on the

breeding flocks, in which different feed ingredients and diet supplements are used (Wilson, 1997). Additional administration of bioavailable Zn in the form of glycine chelate during embryonic development may cause mineral imbalances (Oliveira et al., 2015), with excessive accumulation of zinc and its harmful effects on the embryo. Moreover, the biomass of probiotic bacteria includes microelements such as zinc, facilitating its absorption, which can lead to an increase in its concentrations in the tissues and organs and to toxic effects (Hussain et al., 2022).

Probiotic bacterial strains and zinc positively influence intestinal development and function, which translates to improved digestion, absorption and production results (Shah et al., 2019). In our experiment, the highest body weight in the first 7 d of life was noted in birds receiving the multistrain probiotic and zinc glycine chelate in ovo, although the value of this parameter did not differ statistically from the values obtained in the other groups. Similar observations were reported by Jose et al. (2018), who found that in ovo injection of Zn at 0.25 and 0.50 mg/egg in the form of sulfate, methionate, and nano-oxide did not increase the growth of broilers post-hatch, but weight gains in this group of birds were higher in these groups than in the control. Joshua et al. (2016) also showed that in ovo administration of 40 µg nano-zinc significantly increased BWG and FCR. Similarly, higher body weight and weight gains were noted in chicks posthatch in the case of in ovo administration of probiotic strains (Edens et al., 1997; Teague et al., 2017; Duan et al., 2021). Contrasting results were obtained by Goel et al. (2012), Yair et al. (2013), and Kim and Kang (2022) who showed that in ovo administration of zinc did not improve the growth performance of posthatch chickens. The same applies to in ovo administration of probiotic strains (Majidi-Mosleh et al., 2017; Oladokun et al., 2021), which did not significantly increase production parameters in chicks 42 d after hatching. The data indicate that administration of probiotics in the late embryonic stage can have positive effects on the gastrointestinal tract of birds. Interestingly, the additives used in our study significantly reduced the FCR relative to the control group, with the lowest FCR noted in the group receiving the multistrain probiotic and zinc glycine chelate in ovo. It should be stressed that in ovo administration of probiotics leads to early colonization of the digestive tract by useful microbes and to changes in the intestinal microbiome (Shehata et al., 2021). These processes influence the physiological development of the gastrointestinal tract of the chick in the first 21 d after hatching, including the length of the intestines and gut pH (Shehata et al., 2021). Previous research using rats (Tesán et al., 2011) indicates that the bioavailability of zinc increases when used in combination with probiotics, and it acts synergistically with the probiotic to increase villus height and the total number of goblet cells (Shah et al., 2019). Therefore, combined administration of zinc and probiotics increases the absorption of zinc, which improves production parameters by stimulating metabolism of proteins, sugars and fats (Liu et al.,

2015). The discrepancies in data on the effects of in ovo application of multistrain probiotics and zinc glycine chelate on production parameters suggest the need for further research to determine the optimal probiotic strains, dose of the probiotic, and period of embryonic development when it should be administered to achieve beneficial effects throughout the growth period.

Optimal physiological functioning of poultry in the posthatch period, when birds are exposed to numerous endogenous and exogenous factors, requires interactions between specific immunocompetent cells, including T and B cells, natural killer cells, antigen-presenting cells, and others (Kaiser, 2010; Sławińska et al., 2014a). Early interference in immune mechanisms through in ovo administration of a multistrain probiotic and zinc glycine chelate leads to modulation of innate immune processes, owing to which newly hatched chicks are already able to respond to antigens, thereby reducing the risk of infection after hatching (Sławińska et al., 2014; Alizadeh et al., 2020). In this context, the results of the complete immunophenotypic assessment of cells taking part in the humoral and cellular response can be considered pioneering, enabling reliable determination of the usefulness of in ovo administration of a multistrain probiotic together with zinc glycine chelate.

The highest percentage of CD4⁺ T helper cells in the serum was noted in group III, 12 h after hatching and at 7 d of age. These findings confirm the strong effect of combined administration of a multistrain probiotic and Zn-Gly chelate on lymphocyte differentiation and proliferation and are evidence of stimulation of cellular immune mechanisms in birds. CD4⁺ T cells are involved in various immune response processes, including activation of B lymphocytes, macrophages, and cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (Luckheeram et al., 2012). This is confirmed by the high percentage of these cells in the serum of birds from group III together with the immunophenotype of immunocompetent cells, especially the high expression of KUL01 on monocytes/macrophages. CD4⁺ T cells also take part in antigen presentation by interacting with major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (Vignali, 1994). The high percentage of this subpopulation of cells shown in the study in conjunction with the high expression of MHC II molecules in this group on both sampling days is evidence of enhancement of antigen presentation processes. The results suggest that a multistrain probiotic administered in ovo, containing numerous bacterial antigens, activates an immune response to stimulation with these antigens, whereas T lymphocytes in the serum are a population of functional cells involved in the early immune response to antigens. These cells most likely appear in the serum as a result of selective colonization of the intestinal epithelium by probiotic bacteria and activation of intraepithelial lymphocytes (IELs), which play a critical role in the protective immune response to intestinal pathogens (Wickramasuriya et al., 2022).

Contrasting results were obtained from the analysis of splenic mononuclear cells, which showed that 12 h after

hatching there were no significant differences in the percentage of CD4⁺ cells in the groups receiving a multistrain probiotic. In addition, in group IV, following in ovo administration of Zn-Gly chelate, this expression was lower than in the other experimental groups and the control group. At 7 d as well, the percentage of CD4⁺ T cells was lower in the experimental groups than in the control group. Similar observations were made by Alizadeh et al. (2020), who following in ovo inoculation of multistrain lactobacilli found no changes in the percentage of splenocytes with CD4⁺ expression up to 10 d post-hatch. The low percentage of CD4⁺ cells in the spleen in the experimental groups indicates that no inflammatory processes were taking place in response to the antigens administered in ovo. The high percentage of these cells noted in the control group indicates colonization of the body by environmental antigens stimulating a systemic immune response, manifested by the induction and proliferation of lymphocytes in the lymphoid organs. The differentiation of T cells and regulation of the immune response were additionally confirmed on both sampling days by the high percentage of B cells with Bu-1A expression in the serum and spleen in group III, in which the multistrain probiotic and zinc glycine chelate were administered in ovo. This costimulation of B cells through antigen presentation by T cells improves the immunoglobulin synthesis process and the body's humoral response (Vazquez et al., 2015).

Divergent results were obtained for CD8⁺ lymphocytes. The percentage of these cells in the serum immediately after hatching was lower in group III, which received the multistrain probiotic and zinc glycine chelate in ovo, than in the control group, after which it rose and attained the highest value on d 7. A different pattern was shown for CD8⁺ cells in the spleen, with the highest percentage noted in group III at 12 h after hatching, whereas at 7 d posthatch, it was the lowest in this group. The increase in the percentage of these cells after hatching in the absence of disease symptoms in this group is indicative of immunomodulation of T cells by compounds used in the in ovo supplementation. Performing the role of antigens, the multistrain probiotic and zinc glycine chelate probably stimulate CD8⁺ lymphocytes by enhancing the proliferation and functions of T cells. Contrasting results were obtained by Alizadeh et al. (2020), who observed no differences in the percentage of CD8⁺ cells up to 10 d posthatch following in ovo inoculation of multistrain lactobacilli, whereas administration of lactobacilli increased the expression of cytokines in the spleen, including IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-8, and IL-12. Sławińska et al. (2014) reported that in ovo administration of synbiotics increased mRNA expression of IL-4, IL-6, IFN- β , and IL-18 in the spleen during rearing of chickens. Together with the results of our experiment, these findings indicate that one of the effects of a multistrain probiotic and zinc glycine chelate in poultry is the induction of pro-inflammatory signals activating the cytotoxicity of cells taking part in protection against infection, as well as modulation of the immune response and its Th1/Th2 polarization. This effect maintains the

pro- and anti-inflammatory balance in response to the action of numerous antigens in the form of microbial strains and zinc. The posthatch increase in the activity of Th1 lymphocytes, mainly with CD8⁺ expression, is indicative of promotion of cellular immune mechanisms and does not rule out a developing inflammatory process in response to in ovo application of antigens and environmental factors.

One of the lymphocyte subpopulations analyzed in the experiment was cells with CD4⁺CD25⁺ expression, which have immunosuppressive and functional properties in chickens similar to those of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in mammals (Selvaraj, 2013; Calefi et al., 2016). They have also been shown to function as Treg cells in chickens, suppressing excessive immune reactions and inhibiting excessive development of T lymphocytes (Shanmugasundaram and Selvaraj, 2011). The high percentage of these cells in the serum of group III chickens at 12 h and 7 d after hatching following in ovo administration of the multistrain probiotic and Zn-Gly chelate suggests that some of these cells play an immunosuppressive role as regulator cells. These cells probably inhibit the inflammatory response caused by excessive intake of the multistrain probiotic acting as antigen on the embryo. The simultaneous high percentage of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes in this group additionally confirms the immunoregulatory role of these cells in response to the antigens, that is, the bacterial strains and Zn-Gly chelate. Similarly, the high expression of CD4⁺CD25⁺ cells in the spleen at 12 h and 7 d posthatch, especially in group III, is due to migration of these cells from the peripheral pool and indicates activation of immunoregulatory mechanisms in response to the antigens introduced in ovo.

It should be stressed that it cannot be inferred from the CD4⁺CD25⁺ cell immunophenotype itself that these cells belong to the population of immunosuppressive lymphocytes. For this reason, it seems that they should be included among cells of numerous subsets of lymphocytes with various types of activity, including immunosuppressive, regulatory, or memory, as evidenced by CD25⁺ and TCR expression (Izcue et al., 2006; Teng et al., 2006). The increase in TCR and CD25⁺ expression on lymphocytes at 12 h posthatch in the spleen and at 7 d in the serum suggests that T memory cells produced following in ovo supplementation, tasked with suppressing the immune response, are dominant during this period. At 7 d of age, the percentage of CD25⁺ and TCR cells in the spleen of the chicks was low, which suggests the functioning of CD4⁺CD25⁺ Treg lymphocytes maintaining homeostasis between the pro- and anti-inflammatory response. CD4⁺CD25⁺ cells also migrate between the thymus, bone marrow, and other lymphoid organs in chickens, and mostly likely the surface of the intestinal mucosa is enriched with Treg cells, as in mammals (Shanmugasundaram and Selvaraj, 2011). These phenomena explain why the concentrations of these cells in the experiment are varied. It should be noted that changes of this type are observed especially in consequence of strong antigen

stimulation, which in the experiment was induced by the in ovo supplementation.

Similar patterns as for CD3⁺CD8⁺ expression were also noted for expression of the CD25⁺ molecule. The higher percentage of T lymphocytes with the CD25⁺ phenotype in group III after hatching is evidence of activation of a specific immune response through stimulation of Th1 lymphocytes. The high percentage of these cells in the serum of the same group on d 7 of the experiment indicates proliferation of T lymphocytes and enhancement of the immune response induced by foreign antigens introduced in ovo. The high percentage of CD25⁺ cells in the serum of the birds in group III in combination with the increase in the percentage of CD4 and CD8 cells confirms that the multistrain probiotic and zinc glycine chelate administered in ovo stimulate cellular mechanisms responsible for recognition and elimination of antigens. T lymphocytes activated in this way will also effectively prevent environmental infections in poultry, which may significantly improve the health of the flock.

The high percentage of MHC II cells shown in groups II and III indicates activation of antigen presentation to effector cells, especially Th lymphocytes. MHC II molecules are known to be strongly expressed on macrophages, dendritic cells, B lymphocytes, and activated T lymphocytes (Silva and Gallardo, 2020). These data together with the results obtained for the immunophenotype of T lymphocytes indicate that in ovo administration of a multistrain probiotic, as well as a probiotic in combination with Zn-Gly chelate, through the MHC II complex effectively activates mechanisms of cellular surveillance in the response to the antigens, which is particularly evident in the early posthatching period.

Another cell population analyzed in the experiment was TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells, which perform numerous effector and cytotoxic functions in poultry, taking part in the early stages of the immune response (Smith and Hayday, 2000). $\gamma\delta$ T cells are believed to play an important role in immune processes in the initial period of life and are the first T cells to develop in the thymus and migrate to the peripheral tissues and organs (Bucy et al., 1991). These cells have been shown to be involved in the response to pathogens and to protect the body from tumor development and inflammation (Chien et al., 2014). In chickens, $\gamma\delta$ T cells are the dominant population and can produce various cytokines and interferons. They may also exhibit cytotoxic properties, taking part in the immune response to pathogens and vaccine antigens (Pieper et al., 2008; Kjærup et al., 2014; Fenzl et al., 2017). In our experiment, the birds in group III, receiving in ovo supplementation of a multistrain probiotic and zinc glycine chelate, had a statistically significant high percentage of TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells in the serum and spleen at 12 h after hatching and in the serum at 7 d. These findings are partially in agreement with those reported by Szczypka et al. (2021), who following in ovo stimulation with probiotics and synbiotics noted a high percentage of TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells in the spleen of chickens up to 35 d of life. Our results indicate that a multistrain probiotic

administered in ovo stimulates and promotes mechanisms of the cellular immune response to antigens of the microbiome. The lack of differences in the percentages of these cells in the spleen at 7 d of age between the experimental and control groups is surprising. It can probably be explained by the migration of these cells to the mucosa, mainly of the gastrointestinal tract, and their role in the recognition and elimination of antigens. Huang et al. (2013), however, showed no differences in the percentage of $\gamma\delta$ ⁺ TCR T cells in the intestinal mucosa of poultry in the period between 7 and 14 d of age between a group receiving a probiotic and the control group. At the same time, they noted an increase in the percentage of CD8⁺ cells, which indicates that $\gamma\delta$ T cells stimulate specific expansion of cytotoxic T effector cells, enhancing intestinal immunity and protecting against infection. However, a full understanding of the mechanisms of action of this subpopulation of lymphocytes requires further research.

The percentage of Bu-1A⁺ lymphocytes in the serum and spleen was high in all experimental groups at 12 h and 7 d after hatching, and was highest in group III, in which the birds received a multistrain probiotic and Zn-Gly chelate in ovo. This indicates that a multistrain probiotic and Zn-Gly chelate stimulate humoral immune mechanisms through active B cell production and antibody synthesis. Contrasting results were obtained by Alizadeh et al. (2021, 2022), who found no changes in the percentage of Bu-1A⁺ cells following in ovo supplementation with multistrain lactobacilli. The high expression of Bu-1A on B lymphocytes in the serum and spleen of poultry can be assumed to indicate that the multistrain probiotic and zinc glycine chelate stimulate the humoral response, which is responsible for eliminating antigens entering the body. It is worth noting that Alizadeh et al. (2020), following in ovo inoculation of multistrain lactobacilli, showed an increase in the concentrations of class M and G antibodies in the serum of poultry as a result of stimulation of keyhole limpet hemocyanin (KLH). In addition, in the groups of birds receiving probiotics in ovo, the experiment showed stimulation of a specific immune response mediated by antibodies against the highly immunogenic T-cell-dependent antigen (KLH), which suggests that probiotic bacteria influence acquired immunity. It should be emphasized that stimulation of the immune system with the use of a multistrain probiotic has a positive effect on selection of lymphocytes and their maturation in the lymph nodes and contributes to the production of plasma cells and B memory cells. In addition, previous research has shown that the use of chelates of various organic forms of Zn stimulates B lymphocyte proliferation and differentiation in broilers through cytokine activation and causes changes in the lymphoid organs—the thymus, spleen, and bursa of Fabricius, suggesting stimulation of humoral and cellular immune mechanisms (Bartlett and Smith 2003; Jasim and Al-Qaisy, 2019). Similarly, Chithoti et al. (2012) and Ezzati et al. (2012) showed that zinc methionine promotes the immune response by enhancing T cell maturation and secondary activation

of B cells by T helper cells. These findings together with the results of our experiment indicate that the combined in ovo application of a multistrain probiotic and zinc glycine chelate, through activation of Th1 cells and their release of cytokines, stimulates the type Th2 response, thereby reducing the severity of inflammatory processes and supporting the humoral immune response, while inhibiting the Th1 response.

One of the markers of B cells is the CD79a molecule, an integral membrane protein expressed in the early stage of development of B lymphocytes, preceding expression of CD19, and in the late stage of B cell differentiation, that is, in plasma cells (Mason et al., 1995). Expression of this marker is specific for B lymphocytes and plays an important role in the development, survival and activation of this cell subpopulation (Lai et al., 2000). In the present study, significant differences in the expression of this molecule in the spleen were not observed until 7 d after hatching. The high expression of CD79a in group IV, which received Zn-Gly chelate in ovo, may be explained by the effect of zinc accumulated in the organs of birds, influencing the development of B cells. Zinc deficiencies and disturbances of zinc homeostasis have been shown to impair the differentiation of B cells so that they remain at the pre-B stage (Anzilotti et al., 2019). Administration of highly bioavailable zinc chelate in ovo may therefore increase proliferation of B lymphocytes and humoral immune mechanisms. This is confirmed by the expression of the Bu-1A molecule, which was higher in this group at 7 d posthatch, in both the spleen and the serum. Contrasting results were obtained for CD79a expression in groups II and III, in which the birds received a multistrain probiotic and a multistrain probiotic with zinc glycine chelate, respectively, in ovo. At 7 d of age expression of this molecule in the spleen was lower in both experimental groups, whereas in the serum no differences in this parameter were shown between groups. It may be that in the conditions of the experiment, biosorption of Zn ions by the biomass of microbes supplied in the probiotic formulation led to the gradual release of zinc and its absorption in the intestine. On the other hand, it may indicate limitation of B cell differentiation by the various microbial strains contained in the probiotic administered in ovo. These results in conjunction with the expression of Bu-1A, which was highest in group III in the serum and spleen at 12 h and 7 d posthatch, suggest that probiotic microbes cause strong antigenic stimulation and promotion of humoral immune mechanisms, that is, differentiation of B cells, their activation, and antibody production.

Among innate elements of the body's system of defense against pathogens, particular importance is ascribed to macrophages (Qureshi et al., 2000). Apart from functioning as antigen-presenting cells, they eliminate pathogens through phagocytosis and indirectly by regulating the response of other immunocompetent cells (Qureshi et al., 2000). Tissue macrophages, including those present in the spleen, also take part in immunosurveillance by regulating the response of CD4⁺ T cells (Kurotaki et al., 2011) and in suppression of the immune response to antigens, by stimulating apoptosis (Miyake et al., 2007). In the present study, a statistically significant high percentage of

KUL01⁺ cells was noted in the serum and spleen at 12 h posthatch in the group receiving the multistrain probiotic and zinc glycine chelate in ovo. These results confirm previous findings reported by Alizadeh et al. (2021), who showed that in ovo administration of lactobacilli increases the pool of KUL01⁺ cells in the spleen. The components of probiotic bacterial cells, including exopolysaccharides, peptidoglycans, lipoteichoic acid and their metabolites, such as short-chain fatty acids and amino acids, stimulate the immune system by inducing the proliferation of phagocytic cells and phagocytic activity (Taverniti and Guglielmetti, 2011; Xiu et al., 2018). They also induce production of nitric oxide (NO) and cytokines in macrophages, including TNF- α and IFN- γ , thus taking part in antigen presentation to Th cells and enhancing immunoregulatory processes (Taverniti and Guglielmetti, 2011; Xiu et al., 2018). The high expression of KUL01 and Bu-1A at 12 h posthatch in the group receiving a multistrain probiotic and zinc glycine chelate in ovo demonstrates that these supplements trigger the phagocytic activity of macrophages, take part in presentation of the antigens contained in the probiotic to other immunocompetent cells, and stimulate antibody production. Activated phagocytes, acting in a nonspecific manner, also protect against invasive factors through antigen presentation to T cells and stimulation of cellular defense mechanisms. This translates to increased resistance to infection and improved health parameters in the first few days after hatching. The experiment also showed that combined supplementation with zinc glycine chelate and a multistrain probiotic decreases the percentage of KUL01⁺ cells in the spleen at 7 d after hatching in comparison to the groups receiving the multistrain probiotic or zinc glycine chelate alone, which suggests that zinc and the multistrain probiotic have an immunoregulatory function when administered together. Different results were obtained for the serum, in which the highest percentage of KUL01⁺ cells on d 7 was noted in the group receiving zinc glycine chelate. Zinc acts on a variety of immune cells, affecting the number and functions of phagocytes, neutrophils, monocytes, and macrophages taking part in phagocytosis. Earlier research (Gao et al., 2018) showed that supplementation with zinc increases the percentage of phagocytic monocytes and heterophils, which indicates stimulation of nonspecific defense mechanisms and confirms the results of the present study using zinc glycine chelate in ovo.

CONCLUSION

Combined in ovo administration of multistrain probiotics and zinc glycine chelate has a multidirectional stimulating effect on the immune system of the embryo and chicks in the first period after hatching. The high expression of CD4⁺ and CD8⁺ molecules in the serum and spleen of chicks after in ovo supplementation with multistrain probiotics and Zn-Gly chelate proves the promotion of cellular mechanisms of the immune response, expressed in an increase in the population of antigen-presenting Th1 lymphocytes. This phenomenon

should contribute to more effective elimination of microorganisms in the first period of chicks' life. At the same time, the high percentage of Treg CD4⁺CD25⁺ cells in the serum and spleen of chicks proves the immunoregulatory effect of multistrain probiotics and Zn-Gly chelate administered in ovo on Th1 cells and ensures the maintenance of a balance in the body between the Th1/Th2 response. Stimulation of the cellular response is accompanied by stimulation of the humoral response through activation of B lymphocytes. The weakness of the combined in ovo administration of multistrain probiotics and zinc glycine chelate is the reduction of hatchability of chicks; therefore, further research is needed on the effects of these preparations on the mechanisms of toxicity, embryo mortality, and the regulation of the immune response at the cellular level within the developing embryo.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Greenland Technologia EM, Janowiec, Poland, for supporting research.

This work was financed by the University of Life Sciences in Lublin, Poland (project no. SD/43/WET/2022).

Ethical Statement: All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. The experiment was conducted at the Experimental Station of the Poznan University of Life Sciences, Gorzyń 4, Międzyzchód commune. Consent for all research procedures was obtained from the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval no. 106/2022 of October 17, 2022).

Availability of Data and Materials: All data generated or analyzed during this study are included in this published article, and are available on request from the corresponding author.

DISCLOSURES

The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria, educational grants, participation in speakers' bureaus, membership, employment, consultancy, stock ownership, or other equity interest, expert testimony or patent-licensing arrangements), or nonfinancial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

REFERENCES

- Alizadeh, M., J. Astill, N. Alqazlan, B. Shojadoost, K. Taha-Abdelaziz, J. Bavananthasivam, J. S. Doost, N. Sedeghiisfahani, and S. Sharif. 2022. In ovo co-administration of vitamins (A and D) and probiotic lactobacilli modulates immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* 101:101717.
- Alizadeh, M., J. Bavananthasivam, B. Shojadoost, J. Astill, K. Taha-Abdelaziz, N. Alqazlan, N. Boodhoo, J. S. Doost, and S. Sharif. 2021. In ovo and oral administration of probiotic *Lactobacilli* modulate cell- and antibody-mediated immune responses in newly hatched chicks. *Front Immunol* 12:664387.
- Alizadeh, M., B. Shojadoost, J. Astill, K. Taha-Abdelaziz, S. H. Karimi, J. Bavananthasivam, R. R. Kulkarni, and S. Sharif. 2020. Effects of in ovo inoculation of multi-strain *Lactobacilli* on cytokine gene expression and antibody-mediated immune responses in chickens. *Front. Vet. Sci.* 7:105.
- Anzilotti, C., D. J. Swan, B. Boisson, M. Deobagkar-Lele, C. Oliveira, P. Chabosseau, K. R. Engelhardt, X. Xu, R. Chen, L. Alvarez, R. Berlinguer-Palmini, K. R. Bull, E. Cawthorne, A. P. Cribbs, T. L. Crockford, T. S. Dang, A. Fearn, E. J. Fenech, S. J. de Jong, B. C. Lagerholm, C. S. Ma, D. Sims, B. van den Berg, Y. Xu, A. J. Cant, G. Kleiner, T. R. Leahy, M. T. de la Morena, J. M. Puck, R. S. Shapiro, M. van der Burg, J. R. Chapman, J. C. Christianson, B. Davies, J. A. McGrath, S. Przyborski, M. Santibanez Koref, S. G. Tangye, A. Werner, G. A. Rutter, S. Padilla-Parra, J. L. Casanova, R. J. Cornall, M. E. Conley, and S. Hambleton. 2019. An essential role for the Zn²⁺ transporter ZIP7 in B cell development. *Nat Immunol.* 20:350–361.
- Bar Shira, E., D. Sklan, and A. Friedman. 2005. Impaired immune response in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105:33–45.
- Bartlett, J. R., and M. O. Smith. 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poult. Sci.* 82:1580–1588.
- Bucy, R. P., C. H. Chen, and M. D. Cooper. 1991. Analysis of gamma delta T cells in the chicken. *Semin. Immunol* 3:109–117.
- Calefi, A. S., W. M. Quinteiro-Filho, A. R. Fukushima, D. S. G. da Cruz, A. de Siqueira, F. A. Salvagni, L. B. Namazu, C. O. M. S. Gomes, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo Neto. 2016. Dexamethasone regulates macrophage and Cd4⁺Cd25⁺ cell numbers in the chicken spleen. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 18:93–100.
- Carter, S. D., and H. J. Kim. 2013. Technologies to reduce environmental impact of animal wastes associated with feeding for maximum productivity. *Anim. Front.* 3:42–47.
- Chien, Y., C. Meyer, and M. Bonneville. 2014. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 32:121–155.
- Chitithoti, A. K., R. J. Venkata, R. P. Jwalapu, S. S. Devanesan, and S. Reddy. 2012. Immuno stimulatory effect of dietary supplementation of zinc sulphate and zinc-methionine on immune response in broilers. *Adv. Appl. Sci. Res.* 3:2785–2788.
- Clavijo, V., and M. J. V. Flórez. 2018. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poult. Sci.* 97:1006–1021.
- Cox, C. M., and R. A. Dalloul. 2015. Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in ovo application. *Benef. Microbes* 6:45–52.
- Dai, D., S. G. Wu, H. J. Zhang, G. H. Qi, and J. Wang. 2020. Dynamic alterations in early intestinal development, microbiota and metabolome induced by in ovo feeding of *L*-arginine in a layer chick model. *J. Anim. Sci. Biotechnol* 11:19.
- Dal Bosco, A., S. Mattioli, A. Carboni Mancinelli, E. Cotozzolo, and C. Castellini. 2021. Extensive rearing systems in poultry production: the right chicken for the right farming system. A review of twenty years of scientific research in Perugia University, Italy. *Animals (Basel)* 11:1281.
- de Oliveira, J. E., E. van der Hoeven-Hangoor, I. B. van de Linde, R. C. Montjin, and J. M. van der Vossen. 2014. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on post-hatch *Salmonella* susceptibility. *Poult. Sci.* 93:818–829.
- Duan, A. Y., A. Q. Ju, Y. N. Zhang, Y. J. Qin, L. G. Xue, X. Ma, W. M. Luan, and S. B. Yang. 2021. The effects of in ovo injection of synbiotics on the early growth performance and intestinal health of chicks. *Front. Vet. Sci.* 8:658301.
- Dunisławska, A., A. Sławińska, K. Stadnicka, M. Bednarczyk, P. Gulewicz, D. Jozefiak D., and M. Siwek. 2017. Synbiotics for broiler chickens—in vitro design and evaluation of the influence on host and selected microbiota populations following in ovo delivery. *PLoS One* 12:e0168587.
- Edens, F. W., C. R. Parkhurst, I. A. Casas, and W. J. Dobrogosz. 1997. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poult. Sci.* 76:179–196.
- Elilob, O., and J. Brake. 2004. Identification of critical periods for turning broiler hatching eggs during incubation. *Br. Poult. Sci.* 45:631–637.

- Ellis, R., E. R. Morris, and A. D. Hill. 1982. Bioavailability to rats of iron and zinc in calcium-iron-phytate and calcium-zinc-phytate complexes. *Nutr. Res.* 2:319–322.
- Ernst, R. A., F. A. Bradley, U. K. Abbott, and R. M. Craig. 2004. Egg Candling and Breakout Analysis. (p. 8134). ANR Publication, Oakland, CA, 8134. <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8134.pdf>. Accessed Mar. 2007.
- Ezzati, M. S., M. H. Bozorgmehrfard, P. Bijanzad, S. Rasoulinezhad, H. Moomivand, S. Faramarzi, A. Ghaedi, H. Ghabel, and E. Stabraghi. 2012. Effects of different levels of zinc supplementation on broilers performance and immunity response to Newcastle disease vaccine. *Eur. J. Exp. Biol.* 3:497–501.
- Fair, J. M., K. J. Taylor-McCabe, Y. Shou, and B. L. Marrone. 2008. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125:268–273.
- Feng, J., W. Q. Ma, H. H. Niu, X. Wu, and Y. Wang. 2010. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. *Biol. Trace. Elem. Res.* 133:203–211.
- Fenzl, L., T. W. Göbel, and M. L. Neulen. 2017. $\gamma\delta$ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken. *Dev. Comp. Immunol.* 73:175–183.
- Ferket, P. R. 2006. Incubation and in ovo nutrition affects neonatal development. Pages 18–30 in 33rd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference.
- Fordyce, E. J., R. M. Forbes, K. R. Robins, and J. W. Erdman Jr. 1987. Phytate $\times$ calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? *J. Food Sci.* 52:440–444.
- Gao, H., W. Dai, L. Zhao, J. Min, and F. Wang. 2018. The role of zinc and zinc homeostasis in macrophage function. *J. Immunol. Res.* 2018:6872621.
- Goel, A., S. K. Bhanja, M. Mehra, and V. Pande. 2012. Does in ovo Administration of Zinc or Iodine Modulate Differential Expression of Growth and Immune Related Genes in Broiler Chickens. World Poultry Congress, Salvador, Bahia, Brazil.
- Hashemzadeh, Z., M. A. Karimi Torshizi, S. Rahimi, V. Razban, and T. Zahraei Salehi. 2010. Prevention of *Salmonella* colonization in neonatal broiler chicks by using different routes of probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. *J. Agric. Sci. Tech.* 12:425–432.
- Hedlund, L., T. Palazon, and P. Jensen. 2021. Stress during commercial hatchery processing induces long-time negative cognitive judgement bias in chickens. *Animals* 11:1083.
- Hidayat, C., A. Jayanegara Sumiati, and E. Wina. 2020. Effect of zinc addition on the immune response and production performance of broilers: a meta-analysis. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 33:465–479.
- Hosseini-Mansoub, N., T. Vahdatpour, M. Arjomandi, and S. Vahdatpour. 2011. Comparison of different methods of probiotic prescription against *Salmonella* infection in hatchery broiler chicken. *Adv. Environ. Biol.* 5:1857–1860.
- Hou, T., and E. Tako. 2018. The in ovo feeding administration (*Galus Gallus*)—an emerging in vivo approach to assess bioactive compounds with potential nutritional benefits. *Nutrients* 10:418.
- Huang, A., E. Shibata, H. Nishimura, Y. Igarashi, N. Isobe, and Y. Yoshimura. 2013. Effects of probiotics on the localization of T cell subsets in the intestine of broiler chicks. *J. Poult. Sci.* 50:275–281.
- Hussain, S., M. Khan, T. M. M. Sheikh, M. Z. Mumtaz, T. A. Chohan, S. Shamim, and Y. Liu. 2022. Zinc essentiality, toxicity, and its bacterial bioremediation: a comprehensive insight. *Front. Microbiol.* 13:900740.
- Izcue, A., J. L. Coombes, and F. Powrie. 2006. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 212:256–271.
- Jarosz, Ł., A. Marek, Z. Grądzki, M. Kwiecień, and M. Kalinowski. 2017a. The effect of feed supplementation with zinc chelate and zinc sulphate on selected humoral and cell-mediated immune parameters and cytokine concentration in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 112:59–65.
- Jarosz, M., M. Olbert, G. Wyszogrodzka, K. Młyniec, and T. Librowski. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacol* 25:11–24.
- Jasim, M. S., and N. E. Al-Qaisy. 2019. Effect of in ovo injection of zinc methonine on hatching traits, production performance and immunity response of broiler chickens. *Plant Arch.* 19:1235–1240.
- Jha, R., A. K. Singh, S. Yadav, J. F. D. Berrocoso, and B. Mishra. 2019. Early nutrition programming (in ovo and post-hatch feeding) as a strategy to modulate gut health of poultry. *Front. Vet. Sci.* 6:82.
- Jose, N., A. V. Elangovan, V. B. Awachat, D. Shet, J. Ghosh, and C. G. David. 2018. Response of in ovo administration of zinc on egg hatchability and immune response of commercial broiler chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102:591–595.
- Joshua, P. P., C. Valli, and V. Balakrishnan. 2016. Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. *Vet. World* 9:287–294.
- Kadam, M. M., M. R. Barekatin, S. K. Bhanja, and P. A. Iji. 2013. Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications—a review. *J. Sci. Food Agric.* 93:3654–3661.
- Kaiser, P. 2010. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* 39:309–324.
- Kim, H. J., and H. K. Kang. 2022. Effects of in ovo injection of zinc or diet supplementation of zinc on performance, serum biochemical profiles, and meat quality in broilers. *Animals* 12:630.
- Kjærup, R. M., T. S. Dalgaard, L. R. Norup, E. Hamzić, P. Sørensen, and H. R. Juul-Madsen. 2014. Characterization of cellular and humoral immune responses after IBV infection in chicken lines differing in MBL serum concentration. *Viral Immunol.* 27:529–542.
- Kurotaki, D., S. Kon, K. Bae, K. Ito, Y. Matsui, Y. Nakayama, M. Kanayama, C. Kimura, Y. Narita, T. Nishimura, K. Iwabuchi, M. Mack, N. van Rooijen, S. Sakaguchi, T. Uede, and J. Morimoto. 2011. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *J. Immunol.* 186:2229–2237.
- Lai, R., J. Juco, S. F. Lee, S. Nahiriak, and W. S. Etches. 2000. Flow cytometric detection of CD79a expression in T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* 113:823–830.
- Liu, Z. H., L. Lu, R. L. Wang, H. L. Lei, S. F. Li, L. Y. Zhang, and X. G. Luo. 2015. Effects of supplemental zinc source and level on antioxidant ability and fat metabolism-related enzymes of broilers. *Poult. Sci.* 94:2686–2694.
- Lu, P., T. Morawong, A. Molee, and W. Molee. 2022. Influences of L-Arginine in ovo feeding on the hatchability, growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of slow-growing chickens. *Animals (Basel)* 12:392.
- Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma, and B. Xia. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012:925135.
- Lukić, M., V. Petričević, N. Delić, N. Tolimir, V. Dosković, S. Rakonjac, and Z. Škrbić. 2022. How does the choice of genotype and feed in the local market affect broiler performance and the farm economy? A case study in Serbia. *Agriculture* 12:843.
- Majidi-Mosleh, A., A. A. Sadeghi, S. N. Mousavi, M. Chamani, and A. Zarei. 2017. Effects of in ovo infusion of probiotic strains on performance parameters, jejunal bacterial population and mucin gene expression in broiler chicken. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 19:97–102.
- Mason, D. Y., J. L. Cordell, M. H. Brown, J. Borst, M. Jones, K. Pulford, E. Jaffe, E. Ralfkiaer, F. Dallenbach, and H. Stein. 1995. CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood* 86:1453–1459.
- Meijerhof, R., and R. M. Hulet. 1997. In ovo injection of competitive exclusion culture in broiler hatching eggs. *J. Appl. Poult. Res.* 6:260–266.
- Miyake, Y., K. Asano, H. Kaise, and M. Uemura. 2007. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell – associated antigens. *J. Clin. Invest.* 117:2268–2278.
- Oladokun, S., A. Koehler, J. MacIsaac, E. M. Ibeagha-Awemu, and D. I. Adewole. 2021. *Bacillus subtilis* delivery route: effect on growth performance, intestinal morphology, cecal short-chain fatty acid concentration, and cecal microbiota in broiler chickens. *Poult. Sci.* 100:100809.
- Olatunbosun, O. B., O. M. Sogunle, O. O. Adetola, O. J. Odutayo, T. M. Ayodeji, A. A. Ayoola, and J. A. Abiona. 2023. In ovo feeding of organic salts of zinc and copper: effects on growth performance and health status of two strains of broiler chickens. *Trop. Agric. (Trinidad)* 99:146–165.

- Olejnik, K., E. Popiela, and S. Opaliński. 2022. Emerging precision management methods in poultry sector. *Agriculture* 12:718.
- Oliveira, T. F. B., A. G. Bertechini, R. M. Bricka, E. J. Kim, P. D. Gerard, and E. D. Peebles. 2015. Effects of in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poult. Sci.* 94:2488–2494.
- Pender, C. M., S. Kim, T. D. Potter, M. M. Ritzi, M. Young, and R. A. Dalloul. 2017. In ovo supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. *Poult. Sci.* 96:1052–1062.
- Pieper, J., U. Methner, and A. Berndt. 2008. Heterogeneity of avian $\gamma\delta$ T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124:241–252.
- Qureshi, M. A., C. L. Heggen, and I. Hussain. 2000. Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev. Comp. Immunol.* 24:103–119.
- Roohani, N., R. Hurrell, R. Kelishadi, and R. Schulin. 2013. Zinc and its importance for human health: an integrative review. *J. Res. Med. Sci.* 18:144–157.
- Roto, S. M., Y. M. Kwon, and S. C. Ricke. 2016. Applications of in ovo technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.* 3:63.
- Savarino, G., A. Corsello, and G. Corsello. 2021. Macronutrient balance and micronutrient amounts through growth and development. *Ital. J. Pediatr.* 47:109.
- SAS (Statistical Analysis System). 2011. SAS Version 9.3. Procedure Guide. SAS Inc., Cary, North Carolina, USA. <https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/base/proccstat93m1.pdf>.
- Selvaraj, R. K. 2013. Avian CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Dev. Comp. Immunol.* 41:397–402.
- Shah, M., H. Zaneb, S. Masood, R. U. Khan, S. Ashraf, A. Sikandar, H. F. U. Rehman, and H. U. Rehman. 2019. Effect of dietary supplementation of zinc and multi-microbe probiotic on growth traits and alteration of intestinal architecture in broiler. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11:931–937.
- Shanmugasundaram, R., and R. K. Selvaraj. 2011. Regulatory T cell properties of chicken CD4+CD25+ cells. *J. Immunol.* 186:1997–2002.
- Shehata, A. M., V. K. Paswan, Y. A. Attia, A. E. Abdel-Moneim, M. S. Abougabal, M. Sharaf, R. Elmazoudy, W. T. Alghafari, M. A. Osman, M. R. Farag, and M. Alagawany. 2021. Managing gut microbiota through in ovo nutrition influences early-life programming in broiler chickens. *Animals (Basel)* 11:3491.
- Silva, A. P. D., and R. A. Gallardo. 2020. The chicken MHC: insights into genetic resistance, immunity, and inflammation following infectious bronchitis virus infections. *Vaccines (Basel)* 8:637.
- Ślawińska, A., M. Siwek, J. Żylińska, J. Bardowski, J. Brzezińska, K. A. Gulewicz, M. Nowak, M. Urbanowski, A. Płowiec, and M. Bednarczyk. 2014a. Influence of synbiotics delivered in ovo on immune organs development and structure. *Folia Biol. (Kraków)* 62:277–285.
- Ślawińska, A., M. Z. Siwek, and M. F. Bednarczyk. 2014. Effects of synbiotics injected in ovo on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am. J. Vet. Res.* 75:997–1003.
- Smith, A. L., and A. C. Hayday. 2000. An $\alpha\beta$ T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by $\gamma\delta$ cells. *Immunology* 101:325–332.
- Star, L., J. D. van der Klis, C. Rapp, and T. L. Ward. 2012. Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. *Poult. Sci.* 91:3115–3120.
- Sun, X., L. Lu, X. Liao, L. Zhang, X. Lin, X. Luo, and Q. Ma. 2018. Effect of in ovo zinc injection on the embryonic development and epigenetics-related indices of zinc-deprived broiler breeder eggs. *Biol. Trace Elem. Res.* 185:456–464.
- Swain, P. S., S. B. N. Rao, D. Rajendran, G. Dominic and, and S. Selvaraju. 2016. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: a review. *Anim. Nutr.* 2:134–141.
- Szczypka, M., A. Suszko-Pawłowska, M. Kuczkowski, M. Gorczykowski, M. Lis, A. Kowalczyk, E. Łukaszewicz, D. Poradowski, I. Zbyryt, M. Bednarczyk, and T. Stefaniak. 2021. Effects of selected prebiotics or synbiotics administered in ovo on lymphocyte subsets in bursa of the fabricius, thymus, and spleen in non-immunized and immunized chicken broilers. *Animals (Basel)* 11:476.
- Taha-Abdelaziz, K., D. C. Hodgins, A. Lammers, T. N. Alkie, and S. Sharif. 2018. Effects of early feeding and dietary interventions on development of lymphoid organs and immune competence in neonatal chickens: a review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 201:1–11.
- Tako, E., P. R. Ferket, and Z. Uni. 2005. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. *J. Nutr. Biochem.* 16:339–346.
- Taverniti, V., and S. Guglielmetti. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 6:261–274.
- Teague, K. D., L. E. Graham, J. R. Dunn, H. H. Cheng, N. Anthony, J. D. Latorre, A. Menconi, R. E. Wolfenden, A. D. Wolfenden, B. D. Mahaffey, M. Baxter, X. Hernandez-Velasco, R. Merino-Guzman, L. R. Bielke, B. M. Hargis, and G. Tellez. 2017. In ovo evaluation of FloraMax®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Poult. Sci.* 96:2074–2082.
- Teng, Q. Y., J. Y. Zhou, J. J. Wu, J. Q. Guo, and H. G. Shen. 2006. Characterization of chicken interleukin 2 receptor alpha chain, a homolog to mammalian CD25. *FEBS Lett.* 580:4274–4281.
- Tesán, F., F. Hernández, H. Torti, F. Massot, M. Huarte, E. R. de Celis, M. Barreiro, R. Weill, G. Cremaschi, and J. Boccio. 2011. Glycine-stabilized zinc gluconate has similar bioavailability than zinc sulfate in a zinc fortified probiotic food. *Open Nutraceut. J.* 4:136–143.
- Vazquez, M. I., J. Catalan-Dibene, and A. Zlotnik. 2015. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 74:318–326.
- Vignali, D. A. 1994. The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring Inst. Mitt.* 94:133–147.
- Weese, J. S., and H. Martin. 2011. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. *Can. Vet. J.* 52:43–46.
- Wickramasuriya, S. S., I. Park, K. Lee, Y. Lee, W. H. Kim, H. Nam, and H. S. Lillehoj. 2023. Role of physiology, immunity, microbiota, and infectious diseases in the gut health of poultry. *Vaccines (Basel)* 10:172.
- Willemsen, H., M. Debonne, Q. Swennen, N. Everaert, C. Careghi, H. Han, V. Bruggeman, K. Tona, and E. Decuyper. 2010. Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. *Worlds Poult. Sci. J.* 66:177–188.
- Wilson, H. R. 1997. Effects of maternal nutrition on hatchability. *Poult. Sci.* 76:134–143.
- Wilson, K. M., D. R. Rodrigues, W. N. Briggs, A. F. Duff, K. M. Chasser, and L. R. Bielke. 2019. Evaluation of the impact of in ovo administered bacteria on microbiome of chicks through 10 days of age. *Poult. Sci.* 98:5949–5960.
- Xiu, L., H. Zhang, Z. Hu, Y. Liang, S. Guo, M. Yang, R. Du, and X. Wang. 2018. Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacillus casei* WXD030 strain as a novel adjuvant in vitro and in vivo. *Food Agric. Immunol.* 29:1086–1105.
- Yair, R., R. Shahar, and Z. Uni. 2013. Prenatal nutritional manipulation by enrichment influences bone structure, composition, and mechanical properties. *J. Anim. Sci.* 91:2784–2793.
- Yamawaki, R. A., E. L. Milbradt, M. P. Coppola, J. C. Z. Rodrigues, R. L. Andreatti Filho, C. R. Padovani, and A. S. Okamoto. 2013. Effect of immersion and enoculation in ovo of *Lactobacillus spp.* in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella enteritidis* after hatch. *Poult. Sci.* 92:1560–1563.
- Yegani, M., and D. R. Korver. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult. Sci.* 87:2052–2063.
- Yin, Y., F. Lei, L. Zhu, S. Li, Z. Wu, R. Zhang, G. F. Gao, B. Zhu, and X. Wang. 2010. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME J.* 4:367–376.



Article

Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks

Artur Ciszewski ^{1,*}, Łukasz S. Jarosz ^{1,*}, Arletta Bielecka ², Agnieszka Marek ³, Bartłomiej Szymczak ⁴, Zbigniew Grądzki ¹ and Anna Rysiak ⁵

¹ Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; artur.ciszewski@up.lublin.pl (A.C.)

² Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; arletta.bielecka@up.lublin.pl

³ Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; agnieszka.marek@up.lublin.pl

⁴ Sub-Department of Pathophysiology, Department of Preclinical of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

⁵ Department of Botany, Mycology, and Ecology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

* Correspondence: lukasz.jarosz@up.lublin.pl; Tel.: +48-534680690



Citation: Ciszewski, A.; Jarosz, Ł.S.; Bielecka, A.; Marek, A.; Szymczak, B.; Grądzki, Z.; Rysiak, A. Effect of In Ovo Administration of a Multi-Strain Probiotic and Zinc Glycine Chelate on Antioxidant Capacity and Selected Immune Parameters in Newly Hatched Chicks. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>

Academic Editors: Shihai Zhang and Wutai Guan

Received: 15 September 2023

Revised: 20 October 2023

Accepted: 23 October 2023

Published: 24 October 2023



Copyright: © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of this study was to determine the effect of in ovo co-supplementation of chicken embryos with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and zinc glycine chelate on total antioxidant capacity; concentrations of sulfhydryl groups, bityrosine bridges, formylkynurenines, hydroperoxides, proteins, corticosterone, pro- and anti-inflammatory cytokines and heat shock proteins; and the activity of catalase and superoxide dismutase in the serum, yolk sac and tissues of broiler chickens at 12 h and at 7 days after hatching. The results indicate high SOD activity in the small and large intestines of chicks at 12 h post-hatch in the groups receiving the multi-strain probiotic and in the small intestine and yolk sac of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. High concentrations of TNF- α and IFN- γ in the yolk sac and serum after in ovo administration of Zn-Gly chelate were observed 12 h after hatching. The use of a probiotic and a probiotic with Zn-Gly chelate increased the total antioxidant capacity in the tissues of chickens. It can be concluded that in ovo administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate can maintain the oxidant/antioxidant balance in chickens and increase the defense capacity against oxidative stress.

Keywords: chicken; in ovo; multi-strain probiotic; zinc glycine chelate; antioxidant capacity

1. Introduction

In intensive poultry production aimed at obtaining high-quality poultry products, it is essential to use healthy chicks with good production traits [1,2]. Embryonic development and the post-hatching period are critical to the survival of chicks, which determines the further course of rearing, the final fattening results and the economic success of the farm.

The intensive development of the chicken embryo and the biological processes and metabolic transformations taking place during this period lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) and free radicals, which play an important role in basic biological processes in conditions of health or disease [3,4]. A disturbance of the balance between the rate of ROS production and the capacity of the antioxidant system in the body results in oxidative stress, which leads to increased embryo mortality, impaired growth and development and a negative impact on the immune processes of birds.

These effects can be counteracted by numerous systems that protect cell components against oxidative damage in chicken embryos and developing chicks [5]. These include antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and catalase (CAT) [6,7]; water-soluble antioxidants such as vitamin C and glutathione; fat-soluble antioxidants such as vitamin E and alpha-lipoic acid; carotenoids [8–11], coenzyme Q (CoQ) [12]; and selenium [9]. Essential nutrients for embryonic development are transferred from the feed to the egg yolk and then to the embryonic tissues [5,6,13]. This process is varied, depending in part on the age of the flock of breeding hens, the type of feeding and the composition of the feed, including the use of mineral and vitamin supplements [5,14]. To strengthen antioxidant processes during embryonic development and after hatching, reduce the stress associated with the hatching process, maintain the biochemical and physiological balances in the developing embryo and limit inflammation and the production of cytokines associated with ROS [15–17], in ovo methods are used to supply the embryo with compounds acting as antioxidants [18–20].

Among such compounds, great interest is currently focused on various probiotics and microelements. The mechanisms of action of probiotics on the body are multi-faceted and not fully explained. The interaction between a probiotic administered in ovo and the intestinal microbiome exerts a modulatory effect on the immune system, stimulating innate and acquired mechanisms of resistance to infection by pathogens, thereby reducing inflammation and oxidative stress [21]. It is worth noting that the use of different probiotic strains in the diet has different effects on the parameters of oxidative stress [22]. For example, in ovo administration of *L. salivarius* and *Pediococcus* spp. increases antioxidant potential, while the use of *Citrobacter freundii* 97A11 intensifies pro-inflammatory reactions and the response to oxidative stress [23–25]. In ovo administration of lactic acid bacteria (LAB) has been shown to increase the expression of peroxiredoxin-1 (PRDX1) and superoxide dismutase-1 (SOD1) in intestinal tissue, protecting cells against damage by free radicals and hydrogen peroxide and alleviating symptoms of oxidative stress [23,25].

The term “EM” (effective microorganisms) is often used in the names of products containing microbial strains that do not undergo any technological processing, and published research results indicate a broad range of potential applications of EM in the diet of poultry during growth and rearing [26,27]. However, the literature lacks published results pertaining to the effect of EM on birds following in ovo supplementation.

An important component of probiotic preparations, apart from microorganisms, is chemical elements, especially microelements. Particular attention is focused on the potential use of organic forms of zinc (Zn) in the diet of birds, especially in complexes with glycine, which are more stable and chemically and physically homogeneous than inorganic forms and thus improve the absorption and bioavailability of Zn [28–30]. Zinc in the form of glycine chelates has a particularly positive effect on the growth rate of poultry and certain immune parameters [31,32]. These compounds have been shown to stimulate cellular and humoral immune processes; increase the concentrations of cytokines and class A, G and M immunoglobulins in the peripheral blood; and increase the synthesis of acute-phase proteins with immunoregulatory properties in the serum and tissues of poultry [31–33].

The literature lacks information on the effect of the combined use of multi-strain probiotics containing effective microorganisms and zinc glycine chelate on antioxidant and immune processes in poultry. In our study, we attempted to verify the hypothesis that co-supplementation with multi-strain probiotics containing effective microorganisms and zinc glycine chelate at 17 days (E17) of embryonic development improves health parameters in hatchlings by enhancing antioxidant capacity and immune functions. The results will provide a better understanding of the role of multi-strain probiotics containing effective microorganisms and zinc glycine chelate in antioxidant and immune processes in chicks in the first few days post-hatch.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Statement

The experiment was carried out at the Experimental Station of the Poznań University of Life Sciences, Gorzyń 4, Międzychód Commune. All research procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval No. 106/2022 of 17 October 2022).

2.2. Incubation Period

Hatching eggs were obtained from 36-week-old commercial broilers (Ross × Ross 708) and delivered to the Experimental Station of the Poznań University of Life Sciences, ul. Gorzyń 4, Międzychód Commune. The eggs were stored at 21 °C for 24 h. All eggs were individually weighed and marked, and the surface of the eggshells was disinfected with Viron FF (glutaraldehyde, didecyldimethylammonium chloride, quaternary ammonium compounds and benzyl-C12-C16-alkyldimethyl; DDD-1, Bielsko Biała) in 1 mL of L-1 solution. The eggs were incubated in JARSON Model JD-18 incubators (Gostyń, Poland) from day 1 to day 18 at T 37.8 °C, relative humidity (RH) 55–60%. On the 19th day of incubation (DOI), the eggs were transferred to a JARSON Model ATLAS-180 hatching chamber. For the last three days of incubation (19–21 DOI), RH was maintained at 60–65%. On days 7 and 17 of incubation, all eggs were candled and cracked, and unfertilized and dead embryonic eggs were removed.

On day 17 of incubation, 1400 fertile eggs of similar weight were randomly divided into four groups, with 10 replicates per group and 35 eggs per replicate (350 eggs per group) (Table 1). The multi-strain probiotic EM Provet, manufactured by Greenland Technologia EM (Janowiec, Poland), was delivered in powder form. The exact composition of the probiotic is described in the work of Ciszewski et al. [34]. EM Provet was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to obtain 100 µL of a solution containing 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*. The cell viability of the probiotic bacteria and their content per gram of product (CFU/g) were tested as described by Weese and Martin [35] in the national reference laboratory of the National Veterinary Research Institute in Puławy, Poland. In addition, the manufacturer of EM Provet had assessed the viability of the probiotic bacteria cells and their content per gram of the product, ensuring that it meets all quality criteria for products containing live bacterial cultures. The Zn glycine chelate was manufactured by ARKOP Sp. z o.o. (Bukowno, Poland). The Zn-Gly powder, containing 250 mg Zn-Gly per g of product, was dissolved in deionized water to obtain solutions containing 100 µg Zn-Gly/100 µL MQ water. All procedures are described in detail by Ciszewski et al. [34].

Table 1. In ovo supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate.

Group	Replicates/Number of Eggs per Replicate N=	Volume and Solution of Bioactive Compounds Injected In Ovo at 17 DOI *
I—control group	10/35 350	500 µL 0.9% NaCl
II	10/35 350	100 µL multi-strain probiotic + 400 µL MQ water
III	10/35 350	100 µL multi-strain probiotic + 100 µL Zn-Gly + 300 µL MQ water
IV	10/35 350	100 µL Zn-Gly + 400 µL MQ water

* DOI—day of incubation; N—number of eggs in all replicates; MQ—Milli-Q water. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% isotonic sodium chloride solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (100 µL of multi-strain probiotic contains 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (100 µL of multi-strain probiotic contains 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly).

2.3. In Ovo Inoculations

At 17 DOI, all eggs were decontaminated with 75% ethanol and inoculated through the air chamber (using a 2.5 cm long 23G needle) with 500 μ L of 0.9% saline or bioactive compound, into the amniotic sac. The puncture sites in the eggs were immediately sealed with sterile paraffin, and the eggs were returned to the incubator. The in ovo injection procedure was performed within 30 min. All methods are described in detail by Alizadeh et al. [36,37] (Table 1).

2.4. Birds and Housing

After hatching, 150 day-old chicks from each group were randomly selected for analysis. Each test group had 10 replicates of 15 birds per replicate. The rearing period was 7 days. The birds received a basal diet without bioactive compounds, coccidiostats or antibiotics. They received starter feed S (1–21 days) in the form of crumble. Feed and water were provided as standard. The basal diet was formulated in accordance with nutrition recommendations for Ross 308 broiler chickens (Aviagen, Broiler Ross Nutrition Supplement). The content of nutrients in the diets was calculated from the chemical composition of the feed materials and the metabolic energy value. The basal diet was composed of wheat, soybean meal and maize and contained 22.7% crude protein and 12.47% apparent metabolizable energy corrected to zero nitrogen retention (AMEn). Detailed information is given in the work of Ciszewski et al. [34]. The birds were housed under the same controlled environmental conditions recommended for this line of chickens. The chickens were reared in pens on wood shavings. The pens were equipped with feeding lines and nipple drinkers. Until 7 days of age, the light intensity was 30–40 lux. At that time, the temperature was 31–33 °C and the relative humidity was 60 $\pm$ 10%.

2.5. Collection of Blood and Tissue Samples

Peripheral blood samples were collected 12 h after hatching from chicks killed by decapitation (without having received feed or water) and from the wing vein at 7 days after hatching. Tissues were collected at the same times: from the liver, small and large intestines, heart, pectoral muscle and yolk sac at 12 h after hatching and from the liver, small and large intestines, heart and pectoral muscle of the same chickens at 7 days of age. The blood samples were collected in sterile vacuum tubes with a clotting activator (Vacuette, Medlab Products, Raszyn, Poland). Blood and tissues were sampled from three birds from each replicate (30 samples in total) in each experimental group. Blood and tissue samples were not pooled. The blood samples were transported to the laboratory at +4–8 °C within 1 h and centrifuged at room temperature (20–22 °C) for 15 min at 1000 $\times$ g. Serum and tissue samples were stored at –80 °C for analysis. Individual tissue samples (3 g) were homogenized in an Ultra Turrax homogenizer (Ika-Verkerk, Janke, Kunkel, Staufen, Germany) in phosphate buffer (0.1 mol/L, pH = 7.0), Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail (Sigma, Poland). The homogenates were centrifuged at 4 °C for 20 min at 6500 $\times$ g. The supernatants were divided into aliquots and stored at –20 °C for subsequent analyses.

2.6. Assay of IL-10, IFN- γ , TNF- α , Corticosterone, Hsp 70, Catalase and Superoxide Dismutase (SOD) in Chicken Serum and Tissues

ELISA kits were used to determine IFN- γ , IL-10 and TNF- α (Qayee-Bio, Shanghai, China, No. QY-E80058, QY-E80011 and QY-E80030); corticosterone and Hsp 70 (Biorbyt Ltd., St. Louis, MO, USA No. orb561496 and orb561492); and catalase and superoxide dismutase (SOD) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA No. 707002 and 706002) in the chicken serum and tissues. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in triplicate.

2.7. Total Antioxidant Capacity (T-AOC)

The analysis of total antioxidant capacity (T-AOC) was based on the ferric reducing capacity of the sample as described by Benzie and Strain [38] and Katalinic et al. [39], with some modifications. The mixture, prepared shortly before use, contained 300 mmol/L acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol/L 2,4,6 tri-pyridyl-striazine (TPTZ, Sigma, Poznań, Poland) reagent in 40 mmol/L HCl, and 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ solution in distilled water, in proportions of 10:1:1. Each sample in the amount of 25 μL was added to the mixture (2250 μL), and the absorbance was checked at 593 nm. The working mixture alone was used as a control. The absorbance was read again after 10 min of incubation at room temperature. The difference in absorbance at 0 and after 10 min was compared with a standard curve prepared for 10 different dilutions of Fe (II), between 0 and 1000 $\mu\text{mol/L}$. The absorbance changes were directly related to the “total” reducing ability of the electron-donating antioxidants in the samples. The results were recalculated per protein content in the sample and expressed as $\mu\text{mol/g}$ protein in homogenate tissue. Each determination was performed in duplicate.

2.8. Protein Content

Protein content in the experimental and control samples was determined using the Biuret method, using commercially available assay kits (Cormay, Łomianki, Poland) as described by Gornal et al. [40].

2.9. Content of Sulfhydryl Groups

Concentrations of sulfhydryl (SH) residues in the experimental and control samples were measured using a spectrophotometric method, as detailed by Rice-Evans et al. [41]. Each sample in the amount of 300 μL was added to 300 μL of 10% (*w/v*) sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma, Poznań, Poland) in 10 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 8.0) and thoroughly mixed. Next, 2.4 mL of 10 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 8.0) was added. A 300 μL volume of a solution prepared by diluting 20 mg of 5,5-dithiobis-2-nitro benzoate (Sigma, Poznań, Poland) in 50 mL of sodium phosphate buffer (DTNB) was added, and the absorbance was checked at 412 nm. A 300 μL volume of the same buffer was used in the control sample. Samples were incubated at 37 °C for 1 h, and the absorbance was checked again at 412 nm. The concentration of sulfhydryl groups was indicated by the difference in absorbance before and after incubation (after subtracting the absorbance of the control). The content was determined using a standard curve prepared with glutathione dilutions (GSH, Sigma, Poznań, Poland), ranging from 0 to 1 mmol/L in 10 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 8.0), and expressed in mmol/g protein in homogenate tissue. Each determination was performed in duplicate.

2.10. Content of Bityrosine Bridges

The content of bityrosine bridges was measured using a spectrofluorometer according to Rice-Evans et al. [41]. Experimental and control samples were diluted in 0.9% NaCl. All samples were excited with light at 325 nm, and the emission was checked at 410 nm. The spectrofluorometer (Jasco, Tokyo, Japan) was standardized to 100 deflections with quinine sulfate (0.1 $\mu\text{g/mL}$ in 0.1 mol/ H_2SO_4) at a 350 nm excitation wavelength and a 445 nm emission wavelength. The results were expressed as $\mu\text{g/mg}$ protein in homogenate tissue. Each determination was performed in duplicate.

2.11. Content of Formylkynurenine

Formylkynurenine content was measured using a spectrofluorometer as described by Rice-Evans et al. [41]. Experimental and control samples were diluted in 0.9% NaCl. Next, samples were excited with light at 360 nm, and the emission was measured at 454 nm. The spectrofluorometer was standardized as detailed above. The results were expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein in homogenate tissue. Each determination was performed in duplicate.

2.12. Content of Hydroperoxides

Hydroperoxide content was determined according to Alberti et al. [42]. Each sample in the amount of 20 μL was mixed with 1 mL of 100 mmol/L acetate buffer (pH 4.8). A 10 μL volume of a 3.7×10^{-1} M solution of N,N-diethylparaphenylenediamine (DEPPD) was added. After incubation at 37 °C for 90 min, the absorbance was checked at 505 nm against acetate buffer alone. Distilled water was used as a control. The results were recalculated per protein content in the sample and expressed as $\mu\text{mol}/\text{g}$ protein in homogenate tissue. Each determination was performed in duplicate.

2.13. Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed using Statistica 13.2 PL software (StatSoft, Krakow, Poland). The data gradient was tested using the Shapiro–Wilk test due to deviation from the normal distribution. The significance of statistical differences ($p < 0.05$) was determined using nonparametric tests. Comparisons between groups I–IV were made using Kruskal–Wallis ANOVA as a nonparametric counterpart of one-way analysis of variance and post hoc tests.

The Mann–Whitney U test was used to test the differences within the same group over time, i.e., at 12 h after hatching and at 7 days. The results are presented in graphical form and tables. The same letter designations indicate a lack of statistically significant differences. Capital letters are used to show statistically significant results between groups (U test), and lowercase letters are used to indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. See Figures 1–7 and Tables 2 and S1. The following designations were used for the variables (experimental samples): I—control group; II—+multi-strain probiotic; III—+multi-strain probiotic + zinc glycine chelate (Zn-Gly); IV—+zinc glycine chelate (Zn-Gly).

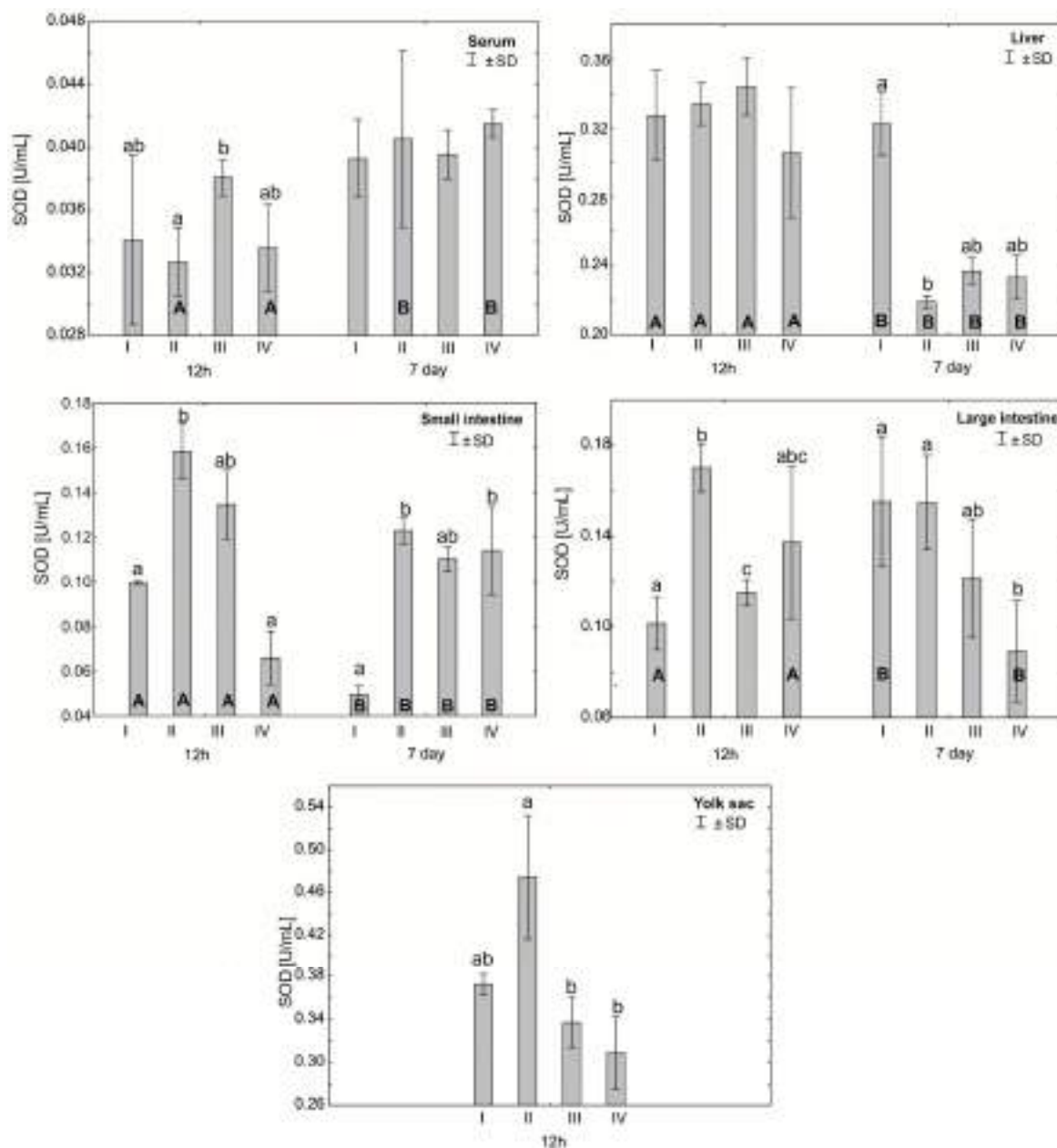


Figure 1. One—way ANOVA and Mann–Whitney U test for superoxide dismutase (SOD) activity in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/− SD—standard deviation. N = 30.

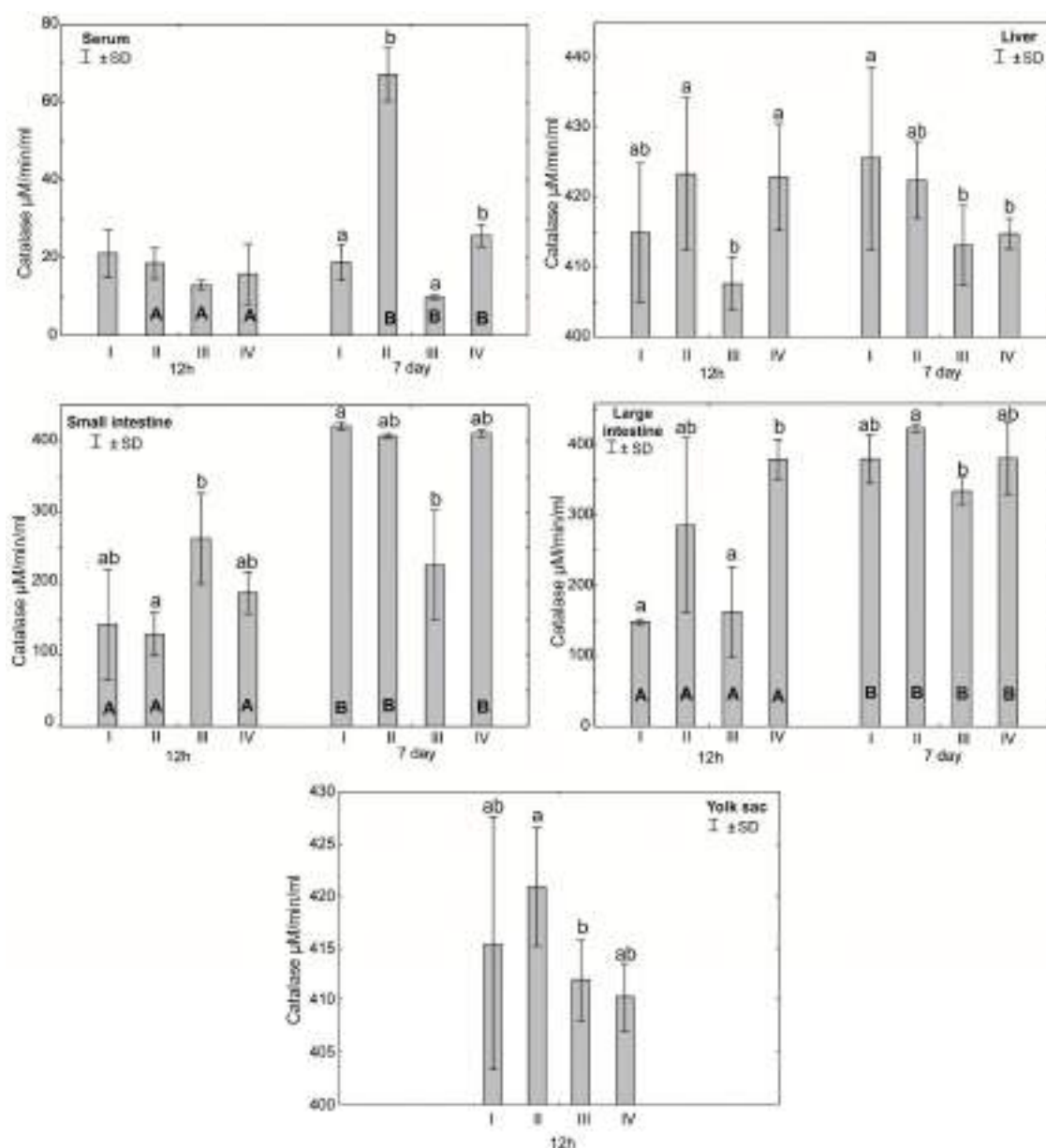


Figure 2. One—way ANOVA and Mann–Whitney U test for catalase (CAT) activity in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/− SD—standard deviation. N = 30.

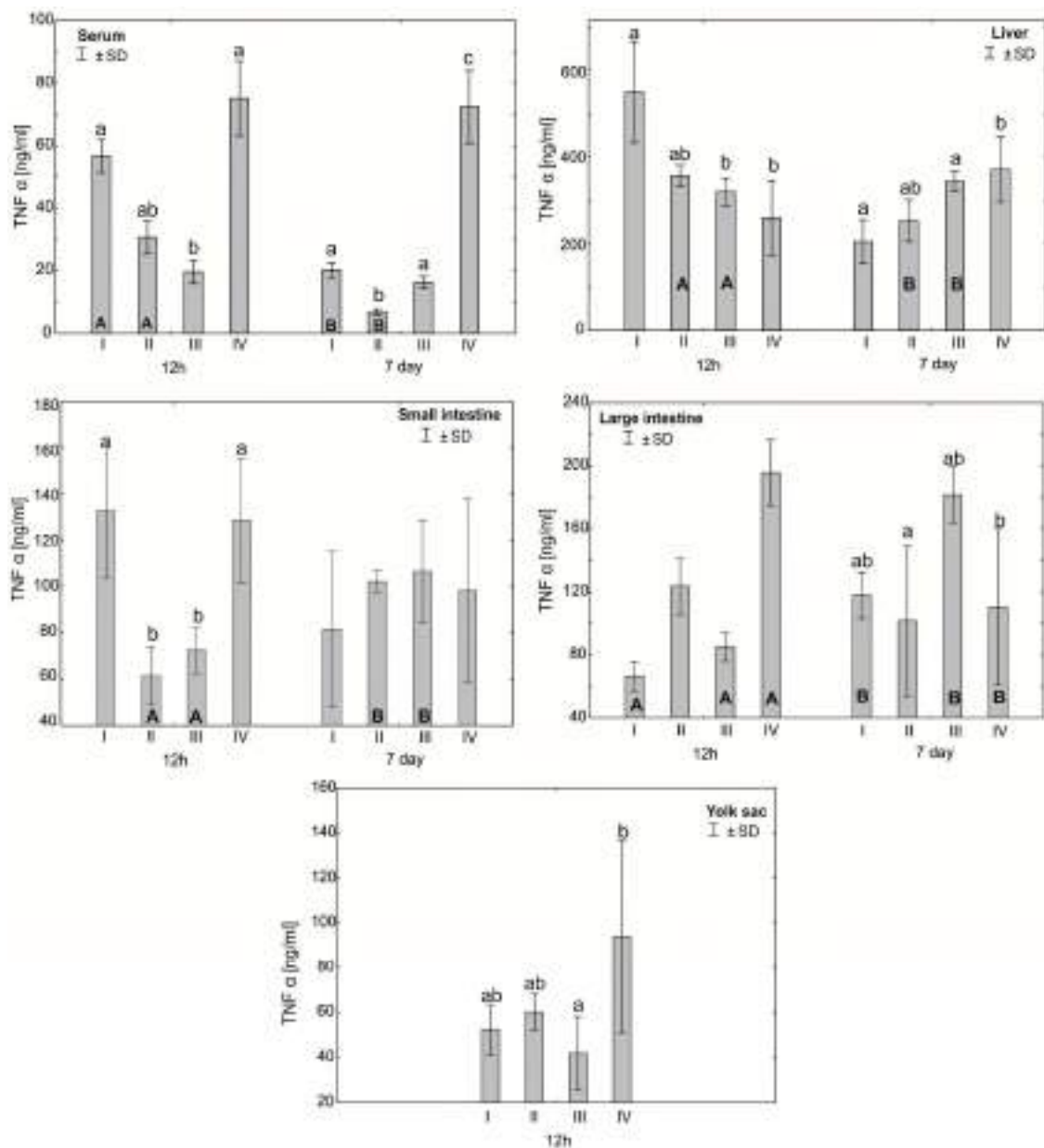


Figure 3. One—way ANOVA and Mann–Whitney U test for tumor necrosis factor α (TNF- α) concentration in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/− SD—standard deviation. N = 30.

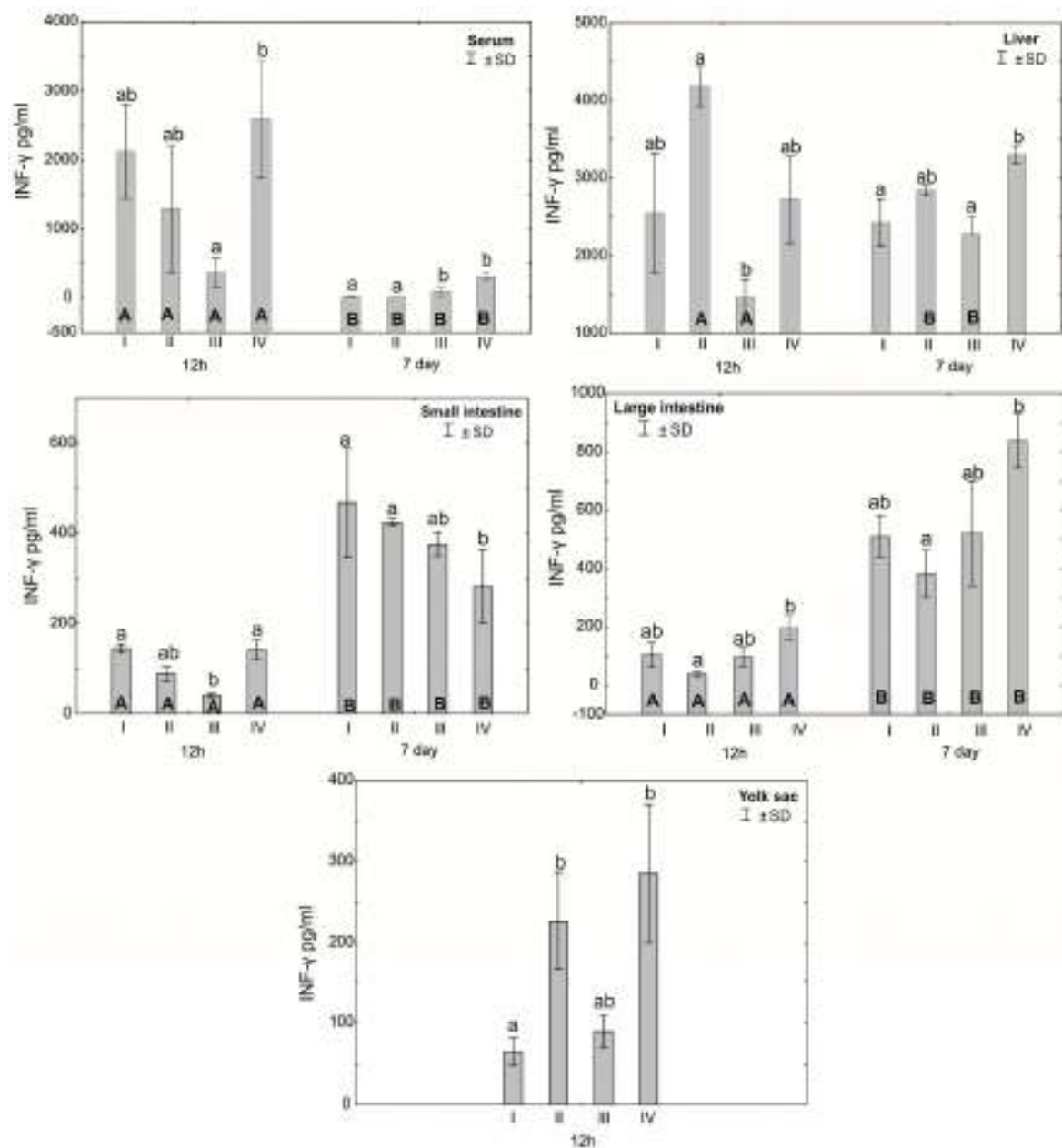


Figure 4. One—way ANOVA and Mann—Whitney U test for interferon γ (IFN- γ) concentration in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal—Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/—SD—standard deviation. N = 30.

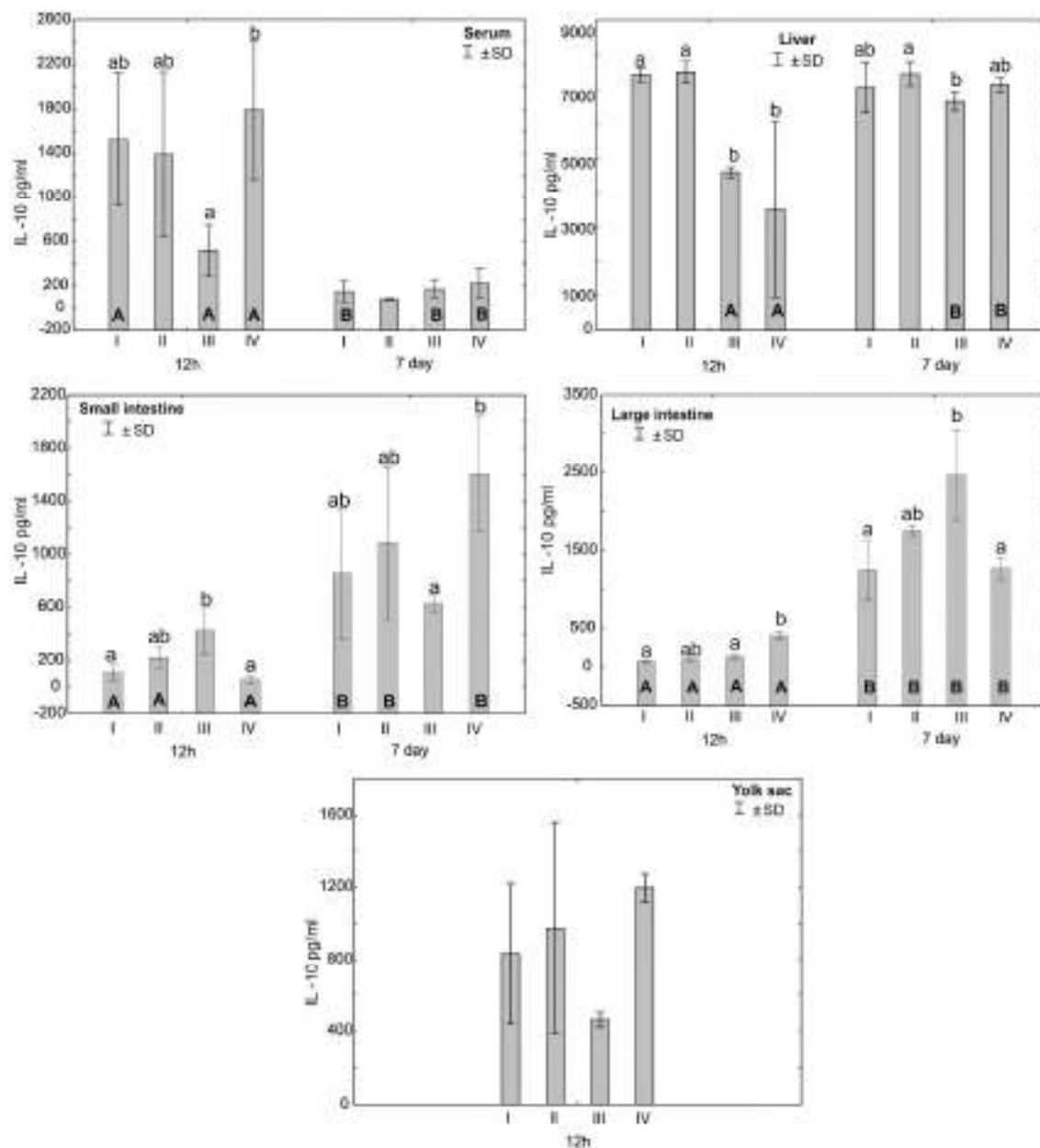


Figure 5. One—way ANOVA and Mann–Whitney U test for interleukin 10 (IL-10) concentration in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/− SD—standard deviation. N = 30.

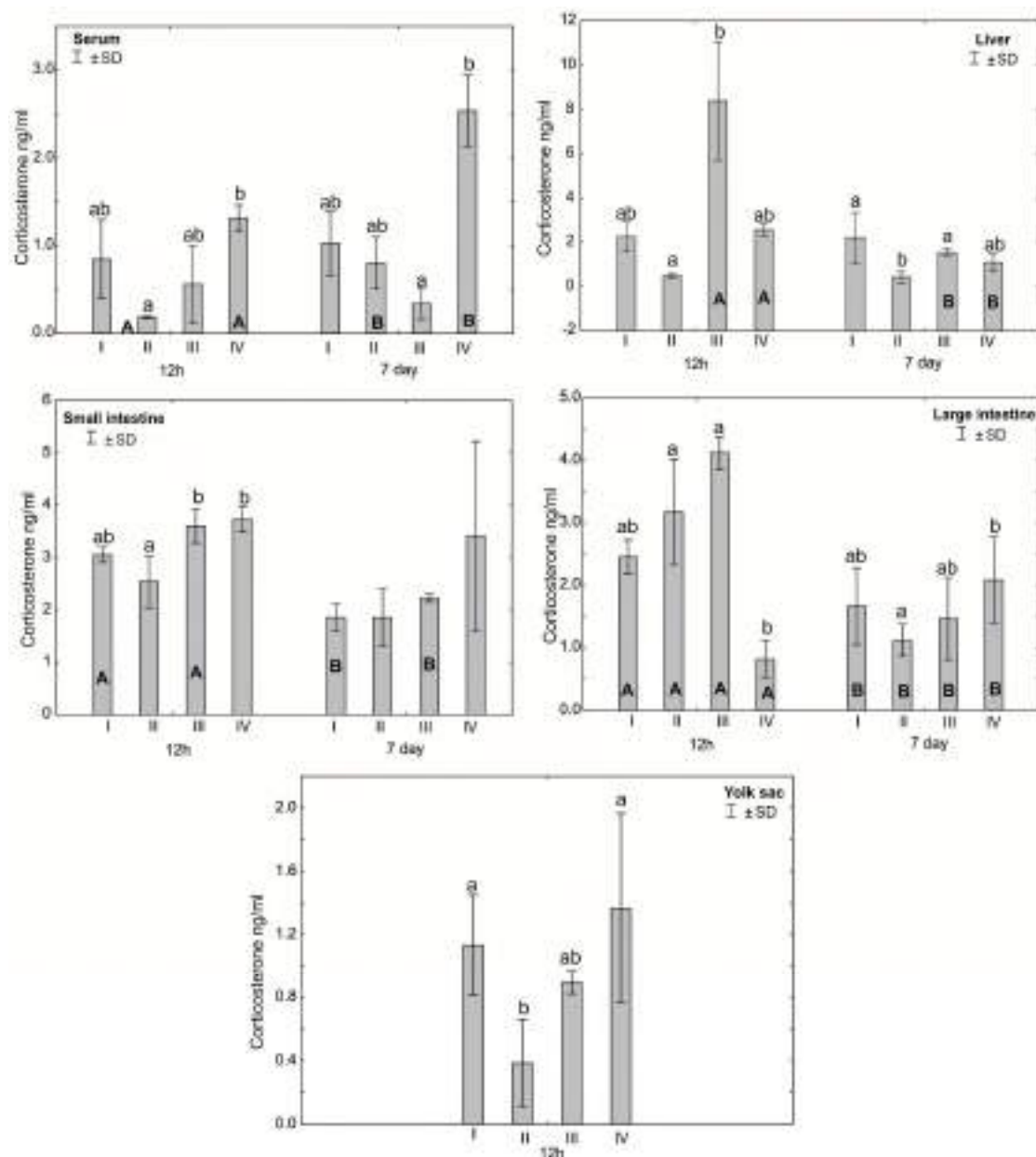


Figure 6. One—way ANOVA and Mann–Whitney U test for corticosterone (CORT) concentration in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/− SD—standard deviation. N = 30.

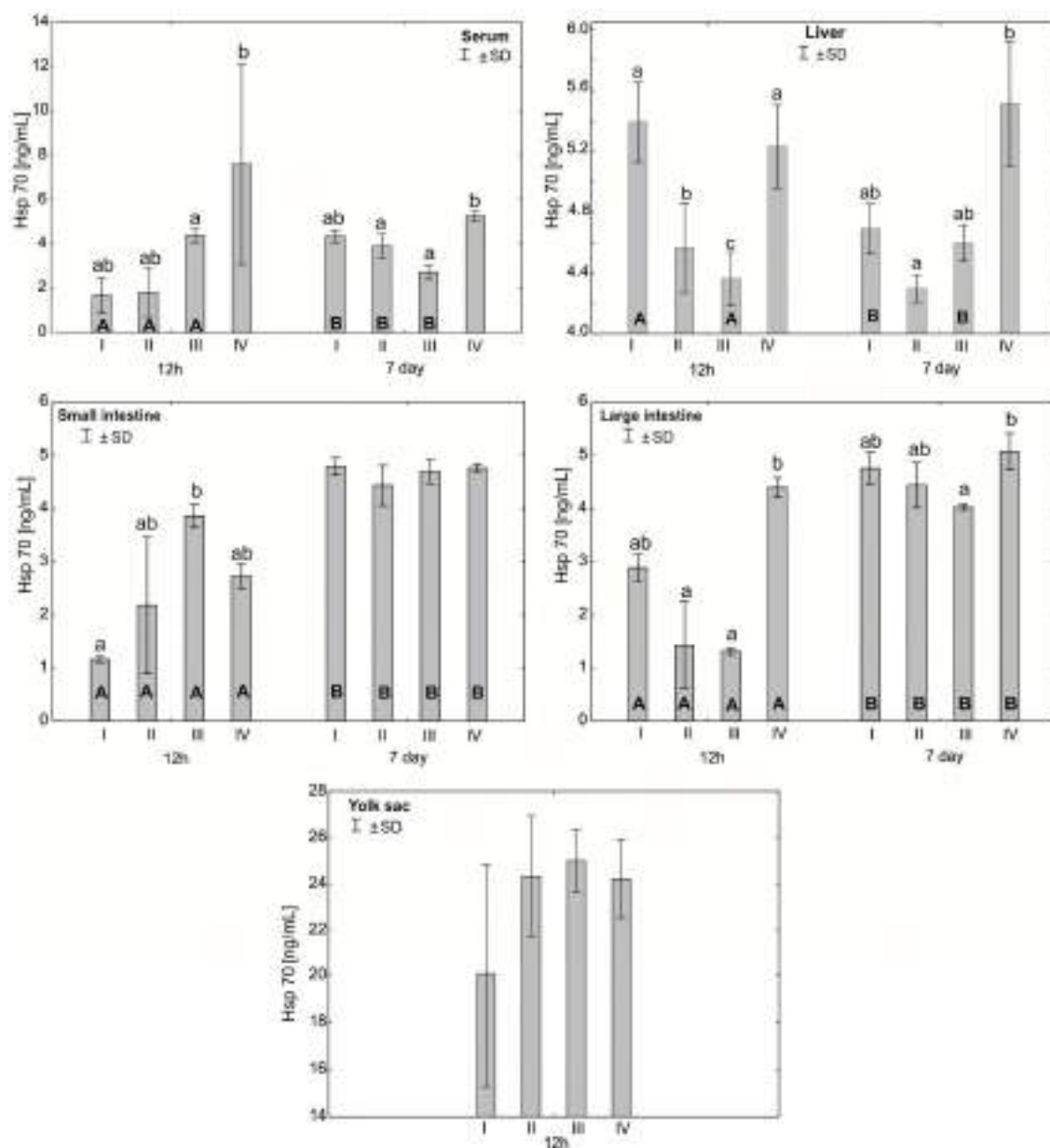


Figure 7. One—way ANOVA and Mann–Whitney U test for heat shock protein (Hsp70) concentration in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Capital letters show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups (U test), and lowercase letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). +/− SD—standard deviation. N = 30.

Table 2. Levels of total antioxidant capacity (T-AOC), protein, sulfhydryl (SH) groups, bityrosine bridges, formylkynurenine and hydroperoxides/DEPPD in the serum and tissues of chicks.

Time	Tissue	N=	Formylkynurenine (µg/mg Protein in Homogenate Tissue)				Sulphydryl Groups/5H (mmol/g Protein in Homogenate Tissue)				
			I	II	III	IV	Groups	I	II	III	IV
12 h	Serum		0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.21 ± 0.01		10.41 ± 0.43 a ***	11.27 ± 0.49 a ***	8.74 ± 0.37 b ***	9.59 ± 0.46 b ***
	Liver		1.10 ± 0.44 a ***	0.76 ± 0.02 a ***	0.51 ± 0.03 ab ***	0.44 ± 0.01 b ***		62.82 ± 1.34 a ***	89.14 ± 0.20 b ***	72.0 ± 2.15 ab ***	80.33 ± 2.92 b ***
	Pectoral muscle	30	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.14	0.29 ± 0.12	0.42 ± 0.07		83.5 ± 6.70 a **	77.74 ± 0.49 a **	94.27 ± 5.15 ab **	98.08 ± 3.46 b **
	Heart		0.35 ± 0.09	0.45 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.38 ± 0.03		66.49 ± 12.36	73.08 ± 5.69	67.49 ± 2.21	73.97 ± 2.81
	Small intestine		0.63 ± 0.09 ab ***	1.27 ± 0.05 a ***	0.47 ± 0.14 b ***	0.30 ± 0.01 b ***		67.98 ± 0.57 a ***	83.65 ± 4.29 ab ***	94.81 ± 5.62 b ***	86.78 ± 5.06 b ***
	Yolk sac		1.23 ± 0.35 b **	1.64 ± 0.50 ab **	2.59 ± 0.21 a **	2.0 ± 0.66 ab **		20.33 ± 3.49 a **	22.62 ± 0.51 a **	13.55 ± 2.8 b **	25.10 ± 6.59 ab **
After 7 days	Serum		0.13 ± 0.03 a *	0.16 ± 0.04 abc *	0.17 ± 0.02 * c	0.19 ± 0.03 b *		11.8 ± 0.68 a *	10.31 ± 0.93 b *	10.72 ± 0.34 b *	11.91 ± 1.28 a *
	Liver		0.78 ± 0.03 abc ***	0.56 ± 0.09 b ***	0.87 ± 0.08 a ***	0.53 ± 0.20 c ***		67.58 ± 5.06 a **	71.91 ± 12.33 ab **	63.61 ± 10.57 a **	86.61 ± 1.82 b **
	Pectoral muscle	30	0.22 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.3 ± 0.18	0.24 ± 0.08		101.27 ± 2.88	102.26 ± 3.24	101.85 ± 5.27	103.29 ± 6.64
	Heart		0.52 ± 0.06 a ***	0.37 ± 0.03 abc ***	0.34 ± 0.00 c ***	0.5 ± 0.04 b ***		95.56 ± 1.07 a ***	75.04 ± 8.77 b ***	88.84 ± 1.88 ab ***	88.76 ± 1.66 ab ***
	Small intestine		0.58 ± 0.11 a **	0.43 ± 0.05 ab ***	0.34 ± 0.02 b **	0.53 ± 0.03 a ***		70.5 ± 3.73	71.05 ± 6.56	70.75 ± 2.24	74.06 ± 0.15
Time	Tissue	N=	Bityrosine bridges (µg/mg protein in homogenate tissue)				T-AOC (µmol/g protein in homogenate tissue)				
			I	II	III	IV	Groups	I	II	III	IV
12 h	Serum		0.73 ± 0.10 ab *	0.86 ± 0.13 ab *	0.61 ± 0.15 a *	0.87 ± 0.08 b *		88.37 ± 7.00 ab ***	94.65 ± 2.72 ab ***	111.8 ± 7.60 a ***	69.79 ± 1.38 b ***
	Liver		6.87 ± 2.24 a ***	6.88 ± 0.19 a ***	3.77 ± 0.15 b ***	3.87 ± 0.05 b ***		56.07 ± 22.62	42.65 ± 5.20	40.76 ± 5.30	57.83 ± 5.48
	Pectoral muscle	30	3.79 ± 1.43	4.31 ± 1.90	3.26 ± 2.03	3.19 ± 0.43		31.38 ± 1.11 ab ***	23.66 ± 2.46 b ***	23.45 ± 1.61 b ***	32.40 ± 0.61 a ***
	Heart		2.68 ± 0.21 a *	3.72 ± 0.64 b *	3.19 ± 0.75 ab *	3.62 ± 0.57 ab *		26.47 ± 3.16 ab *	25.12 ± 2.44 ab *	24.20 ± 1.12 b *	30.83 ± 2.68 a *
	Small intestine		5.58 ± 1.90 ab ***	9.21 ± 2.99 a ***	4.14 ± 1.07 ab ***	2.75 ± 0.29 b ***		57.31 ± 6.56 a ***	99.75 ± 13.51 b ***	97.53 ± 14.11 b ***	54.48 ± 1.98 a ***
	Yolk sac		4.44 ± 0.39 a **	5.94 ± 1.54 ab **	7.31 ± 0.40 b **	6.79 ± 0.22 ab **		21.38 ± 1.01 a **	45.10 ± 11.07 b **	44.19 ± 7.84 ab **	49.96 ± 6.81 b **

Table 2. Cont.

Time	Tissue	N=	Bityrosine bridges (µg/mg protein in homogenate tissue)				T-AOC (µmol/g protein in homogenate tissue)			
			Groups							
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
After 7 days	Serum		0.32 ± 0.16	0.46 ± 0.02	0.5 ± 0.11	0.46 ± 0.06	30.05 ± 2.18 a *	44.13 ± 0.55 b *	37.14 ± 2.99 ab *	44.73 ± 14.51 ab *
	Liver		5.38 ± 0.15 a ***	3.30 ± 0.70 b ***	4.02 ± 0.43 ab ***	1.92 ± 0.50 b ***	77.95 ± 5.96 a **	82.30 ± 16.71 ab ***	78.61 ± 9.84 a ***	108.71 ± 6.29 b ***
	Pectoral muscle	30	1.92 ± 0.11 a *	2.12 ± 0.20 ab *	2.48 ± 0.30 b *	2.19 ± 0.33 ab *	18.16 ± 1.85 ab ***	15.71 ± 0.17 b ***	19.04 ± 0.26 ab ***	24.76 ± 2.66 a ***
	Heart		2.30 ± 0.23 ab ***	1.59 ± 0.70 a ***	1.53 ± 0.12 a ***	3.99 ± 0.24 b ***	26.61 ± 0.66 a *	24.97 ± 1.55 ab *	22.30 ± 0.71 b *	24.37 ± 3.16 ab *
	Small intestine		3.85 ± 0.45	3.00 ± 0.34	2.39 ± 0.10	3.88 ± 0.24	55.63 ± 8.46 ab *	61.96 ± 8.85 a *	58.57 ± 1.65 ab *	48.38 ± 1.69 b *
Time	Tissue	N=	Protein (g/L in homogenate tissue)				Hydroperoxides/DEPPD (µmol/g protein in homogenate tissue)			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
12 h	Serum		25.71 ± 0.68 a **	25.93 ± 1.03 a **	29.28 ± 1.57 b **	27.9 ± 0.72 ab **	0.04 ± 0.01 a **	0.04 ± 0.01 a **	0.05 ± 0.02 ab **	0.10 ± 0.01 b **
	Liver		51.41 ± 2.00 a ***	47.34 ± 7.90 a ***	65.52 ± 4.98 b ***	63.46 ± 2.33 b ***	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.01
	Pectoral muscle		6.36 ± 0.18 a ***	8.57 ± 1.08 b ***	11.56 ± 0.87 b ***	7.06 ± 0.18 a ***	0.15 ± 0.03 a ***	0.18 ± 0.01 a ***	0.25 ± 0.02 b ***	0.23 ± 0.02 b ***
	Heart	30	12.49 ± 2.59 a **	8.36 ± 0.55 b **	12.37 ± 0.12 a **	9.76 ± 0.88 ab **	0.18 ± 0.00 a ***	0.20 ± 0.01 ab ***	0.22 ± 0.03 ab ***	0.26 ± 0.01 b ***
	Small intestine		7.51 ± 1.83 ab ***	5.49 ± 1.12 a ***	15.45 ± 1.21 b ***	15.37 ± 0.25 b ***	0.21 ± 0.001	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01
After 7 days	Yolk sac		41.26 ± 0.17 a ***	26.45 ± 9.67 ab ***	19.05 ± 0.35 ab ***	10.95 ± 3.67 b ***	0.20 ± 0.001 a ***	0.19 ± 0.01 ab ***	0.18 ± 0.003 b ***	0.18 ± 0.01 b ***
	Serum		27.33 ± 1.07 a *	26.51 ± 1.86 ab *	26.94 ± 0.45 ab *	24.76 ± 0.75 b *	0.07 ± 0.03 *	0.09 ± 0.04 *	0.05 ± 0.006 *	0.06 ± 0.02 *
	Liver		37.09 ± 7.99	39.25 ± 7.06	38.77 ± 10.37	28.84 ± 2.00	0.37 ± 0.01 a ***	0.32 ± 0.002 a ***	0.30 ± 0.01 b ***	0.31 ± 0.01 b ***
	Pectoral muscle		22.08 ± 2.29 a ***	24.07 ± 1.49 a ***	14.38 ± 0.27 b ***	20.51 ± 0.37 ab ***	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.005
	Heart	30	10.38 ± 0.19 a **	10.31 ± 1.53 a **	12.62 ± 0.46 b **	11.90 ± 1.06 ab **	0.30 ± 0.01 ab **	0.32 ± 0.01 a **	0.30 ± 0.002 ab **	0.28 ± 0.01 b **
	Small intestine		23.32 ± 1.64 ab **	29.73 ± 6.81 a **	25.98 ± 1.26 a **	20.94 ± 1.48 b **	0.24 ± 0.00 a ***	0.23 ± 0.00 ab ***	0.22 ± 0.01 b ***	0.25 ± 0.003 a ***

Values are expressed as mean and standard deviation (±SD). One-way ANOVA and the Mann–Whitney U test were used to show the statistical significance of differences in the serum and tissues of broiler chickens at 12 h after hatching and at 7 days of age. Level of statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Lowercase letters (a, b, c) indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc tests. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Significant differences in the Mann–Whitney U test between groups at the analysis times are shown in bold. I—control group—eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III—eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV—eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). SD—standard deviation. N—number of samples of serum, liver, pectoral muscle, heart, small intestine and yolk sac tested in each group at 12 h after hatching and at 7 days of age.

3. Results

3.1. Mean Activity of Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) in the Serum and Tissues of Chicks

Statistically significant differences were observed in the average superoxide dismutase (SOD) activity in the chicken serum 12 h after hatching between group III and group II. Statistically significant differences in SOD activity between 12 h and 7 days of the study were observed only in groups II and IV. After 7 days of the experiment, statistically significant differences were also observed between groups I and II in the liver cells. After 12 h of the experiment, statistically significant differences were observed in SOD activity in the small intestinal cells in group II compared to groups I and IV. After 7 days, however, statistically significant differences were found in the small intestine between groups III and IV. Statistically significant differences in SOD activity in colon cells after 12 h of the experiment were observed between the control group (I) and groups II and III and between groups II and III. After 7 days, statistically significant differences in SOD activity in the large intestine were observed in group IV compared to groups I and II. The average SOD activity in the yolk sac was statistically significantly different in group II compared to groups III and IV. See Figure 1 and Table S1.

After 7 days, statistically significant differences in serum catalase activity were observed in groups II and IV compared to groups I and III. Statistically significant differences in catalase activity were found in the small intestine after 12 h of the experiment between groups III and II and after 7 days between groups I and III. Catalase activity in the large intestine after 12 h of the experiment was statistically significantly different in groups I and III compared to group IV. After 7 days post-hatch, catalase activity in the large intestine differed statistically significantly between groups III and II. Statistically significant differences in mean catalase activity in the yolk sac were observed between groups II and III. Statistically significant differences in catalase activity in the large intestine were observed in all groups after 7 days of the experiment compared to 12 h after hatching. Statistically significant differences in the activity of this enzyme in the serum, depending on the day of analysis, were observed in groups II–IV. Statistically significant differences in small intestinal catalase activity were observed 7 days after hatching compared to 12 h after hatching in groups I, II and IV (Figure 2, Table S1).

3.2. Concentration of Cytokines TNF- α , IFN- γ and IL-10 in the Serum, Liver, Intestines and Yolk Sacs of Chickens

The mean TNF- α concentration in the serum after 12 h of the experiment was statistically significantly different in the control group I and group IV compared to group III. After 7 days of the experiment, the serum concentration of TNF- α showed statistically significant differences in groups I, III and IV compared to group II. The analysis of the TNF- α concentration in the liver after 12 h of the experiment showed statistically significant differences in group I compared to groups III and IV. After 7 days of the experiment, statistically significant differences were found in the concentration of TNF- α in the liver between group IV and groups I and III. In the small intestine, the concentration of TNF- α after 12 h of the experiment differed statistically significantly in groups I and IV compared to groups II and III. The analysis of the concentration of this cytokine in the large intestine after 7 days of the experiment showed statistically significant differences between group II and group III. The concentration of TNF- α in the yolk sac in group III differed statistically significantly from the value obtained in group IV. Depending on the time of sampling, statistically significant differences were observed in the serum TNF- α concentration in groups I and II. The level of this cytokine in the liver in groups II and III also differed statistically significantly after 7 days of the study compared to the values obtained after 12 h. Similarly, the concentration of TNF- α in the small intestine differed statistically significantly in groups II and III compared to the values obtained after 7 days of the experiment. Statistically significant differences in the TNF- α concentration were also observed in the large intestine in groups I, III and IV (Figure 3, Table S1).

The average concentration of IFN- γ in the serum after 12 h of the experiment differed statistically significantly between group IV and group III, and after 7 days, statistically significant differences were found in the serum of birds from groups III and IV compared to the control group (I) and group II. Statistically significant differences in the concentration of IFN- γ in the liver of birds after 12 h of the experiment were observed between groups II and III, while after 7 days, statistically significant differences in this parameter were observed between group IV and groups I and III. The concentration of IFN- γ in the small intestine after 12 h was statistically significantly different in groups I and IV compared to group III. After 7 days of the experiment, the concentration of IFN- γ in the small intestine was statistically significantly different in groups I and II compared to group IV. Statistically significant differences in the concentration of IFN- γ in the large intestine were observed both after 12 h and after 7 days of the experiment between groups II and IV. The concentration of IFN- γ in the yolk sac differed statistically significantly between groups II and IV and group I (control). Statistically significant differences were observed in the concentration of IFN- γ in the serum and in the small and large intestines depending on the measurement time (12 h and 7 days) in all experimental groups. Statistically significant differences in the concentration of IFN- γ were observed in the liver depending on the time of analysis in groups II and III. See Figure 4 and Table S1.

Statistically significant differences in serum IL-10 concentrations were observed after 12 h between group II and group IV. Statistically significant differences were observed in the concentration of IL-10 in the liver after 12 h of the experiment for groups I and II compared to groups III and IV. After 7 days of the experiment, the concentration of IL-10 in the liver was statistically significantly different between groups II and III. The concentration of IL-10 in the small intestine after 12 h of the experiment was statistically significantly different in group III compared to groups I and II. Seven days after hatching, the concentration of IL-10 in the small intestine differed statistically significantly between group IV and group III. The concentration of IL-10 in the large intestine after 12 h of the experiment was statistically significantly different in groups I and II compared to group IV. The concentration of IL-10 in the large intestine 12 h after hatching was statistically significantly different in all groups compared to 7 days after hatching. Statistically significant differences in the concentration of IL-10 in the blood serum were also observed in groups I, III and IV at 7 days post-hatch compared to the concentration obtained 12 h after hatching. The concentration of IL-10 in the liver in groups III and IV after 12 h of the experiment differed statistically significantly from the concentration recorded in these groups 7 days after hatching. In the small intestine, statistically significant differences in the IL-10 concentration were observed depending on the analysis time in groups I, II and IV (Figure 5, Table S1).

3.3. Corticosterone (CORT) Concentration in the Serum and Tissues of Chicks

Statistically significant differences in the concentration of corticosterone in the blood serum were observed between group IV and group II after 12 h of the experiment and between group IV and group III after 7 days. In the liver, after 12 h of the experiment, statistically significant differences in the corticosterone concentration were observed between groups II and III. Statistically significant differences in the hormone concentration in the small intestine were noted after 12 h in groups III and IV compared to group II. Statistically significant differences in the corticosterone concentration were observed in the large intestine after 12 h of the experiment in group IV compared to groups III and II. After 7 days of the experiment, statistically significant differences were found in the average corticosterone concentration in the large intestine between groups II and IV. Statistically significant differences were found in the concentration of corticosterone in the yolk sac after 12 h of the experiment in group II compared to groups IV and I. Statistically significant differences in the concentration of corticosterone in the large intestine were observed in all groups in the period from 12 h to 7 days after hatching. Statistically significant differences were observed in the serum corticosterone concentration in groups II and IV after 12 h of the experiment compared to the serum corticosterone level 7 days after hatching. Statisti-

cally significant differences in the corticosterone concentration were observed in the liver depending on the day of analysis in groups III and IV (Figure 6, Table S1).

3.4. Heat Shock Protein (Hsp70) Concentration in the Serum and Tissues of Chicks

In the serum, the Hsp70 concentration at 12 h post-hatch was statistically significantly different between group IV and group III. After 7 days of the experiment, statistically significant differences were observed in group IV compared to groups II and III. In the liver, statistically significant differences in the Hsp70 concentration after 12 h of the experiment were observed in groups II and III compared to the control group I and in group III compared to groups II and IV. Statistically significant differences were also observed in the large intestine between group IV and groups II and III after 12 h of the experiment. After 7 days of the experiment, statistically significant differences in the Hsp70 concentration in the large intestine were observed between groups IV and III. Statistically significant differences in the Hsp70 concentration between 12 h and 7 days of the experiment were observed in the serum in groups I, II and III and in the liver in groups I and III. In all groups, statistically significant differences in the concentration of the protein were also noted in the small and large intestines between 12 h and 7 days of the study. See Figure 7 and Table S1.

3.5. Levels of Total Antioxidant Capacity (T-AOC), Protein, Sulphydryl (SH) Groups, Bityrosine Bridges, Formylkynurenine and Hydroperoxides/DEPPD in the Serum and Tissues of Chicks

Statistically significant differences were found in the T-AOC of the serum after 12 h between groups III and IV. After 7 days of the experiment, statistically significant differences were observed in the serum T-AOC between groups I and II. Statistically significant differences in the liver after 7 days of the experiment were found in group IV compared to groups I and III. T-AOC analysis in the pectoral muscle showed statistically significant differences in group IV compared to groups II and III after 12 h of the experiment and between groups II and IV after 7 days of the experiment. The analysis of the mean T-AOC in the heart showed statistically significant differences between groups III and IV after 12 h and between groups I and III after 7 days. The mean T-AOC in the small intestine after 12 h of the experiment was statistically significantly different in groups III and II compared to groups I and IV. Statistically significant differences were also observed in the mean T-AOC in the yolk sac after 12 h of the experiment in group I compared to groups II and IV. Statistically significant differences in T-AOC depending on the day of the study (12 h and 7 days) were observed in the serum and pectoral muscle in all experimental groups, in the liver and small intestine in groups II-IV and in the heart in groups III and IV. See Table 2.

Statistically significant differences in the serum protein concentration were noted in group III compared to groups I and II after 12 h of the experiment. After 7 days, statistically significant differences were observed in the serum between groups I and IV. In the liver, the protein level after 12 h was statistically significantly different in groups III and IV compared to groups I and II. In the breast muscle, 12 h after hatching, statistically significant differences in the protein concentration were observed in groups I and IV compared to groups II and III. After 7 days, a statistically significant difference was also found in the average protein concentration in the pectoral muscle between group III and groups I and II. In the heart, the average protein level after 12 h of the experiment was statistically significantly different in groups I and III compared to group II. After 7 days, the protein level in the heart in group III was statistically significantly different from that in groups I and II. In the small intestine, the average protein level after 12 h of the experiment was statistically significantly different in group II compared to groups III and IV. After 7 days of the experiment, the protein level in the small intestine was statistically significantly different in groups II and III compared to group IV. The protein level in the yolk sac differed statistically significantly in group IV compared to group I. Statistically significant differences in protein concentrations between 12 h and 7 days of the study were found in the breast muscle and small intestine in all experimental groups. Statistically significant

differences were observed in the serum and liver in groups I, III and IV and in the heart in groups II and IV (Table 2).

Statistically significant differences were observed after 12 h of the experiment in the serum, where the level of SH groups differed statistically significantly in groups I and II compared to groups III and IV. After 7 days, statistically significant differences were observed in the mean serum SH levels in groups I and IV compared to groups II and III. In the liver, after 12 h of the experiment, the level of SH groups differed statistically significantly in group I from the levels in groups II and IV. After 7 days, the level of SH groups in the liver was statistically significantly different in group IV compared to groups I and III. The average level of SH groups in the pectoral muscle was statistically significantly different in group IV compared to groups I and II. In the small intestine, after 12 h of the experiment, the average level of SH groups differed statistically significantly in groups III and IV compared to group I. Statistically significant differences were also found in the average level of SH groups in the yolk sac between group III and groups I and II. Statistically significant differences in the average level of SH groups in the heart were observed after 7 days of the experiment in group II compared to group I. Statistically significant differences in the level of SH groups between 12 h and 7 days of the experiment were observed in groups I, III and IV in the serum and heart; in groups II and IV in the liver; in groups I and II in the pectoral muscle; and in groups II, III and IV in the small intestine (Table 2).

Statistically significant differences were observed in the average content of bityrosine bridges in the serum after 12 h between groups IV and III and in the liver after 12 h in groups I and II compared to groups III and IV. The analysis of the concentration of bityrosine bridges in the liver after 7 days showed statistically significant differences in group I compared to groups II and IV. The average content of bityrosine bridges in the pectoral muscle after 7 days of the experiment was statistically significantly different in group III compared to group I. Statistically significant differences in the heart were observed after 12 h of the experiment between groups I and II and after 7 days in groups II and III compared to group IV. Statistically significant differences in the average content of bityrosine bridges in the small intestine after 12 h of the experiment were observed between group IV and group II. The analysis of the average content of bityrosine bridges in the yolk sac showed statistically significant differences between group I and group III. Statistically significant differences in the average content of bityrosine bridges depending on the day of the study (12 h and 7 days) were observed in the serum and pectoral muscle in groups I, II and IV; in the heart in groups I–III; and in the small intestine in groups II–IV (Table 2).

After 12 h of the experiment, statistically significant differences were observed in the average concentration of formylkynurenine in the liver cells in group IV compared to groups I and II. The average concentration of formylkynurenine in the cells of the small intestine was statistically significantly different in group II compared to groups III and IV. The average concentration of formylkynurenine in the yolk sac in group III differed statistically significantly from the concentration in group I. After 7 days of the experiment, statistically significant differences were observed in all examined tissues except the pectoral muscle. The concentration of the metabolite in the serum differed statistically significantly between group I and groups III and IV. Its average concentration in the liver cells differed statistically significantly in group III compared to groups II and IV. Statistically significant differences were also observed in the concentration of formylkynurenine in the liver between groups II and IV. However, the mean concentration in the heart differed statistically significantly in groups III and IV compared to group I and between groups III and IV. Similarly, the mean concentration of formylkynurenine in the small intestine was statistically significantly different in group III compared to groups I and IV. The analysis of the formylkynurenine concentration within groups depending on the analysis time showed statistically significant differences in the serum in groups I and II and in the pectoral muscle in groups I, II and IV. Similarly, statistically significant differences in the concentration of formylkynurenine in the liver and heart cells were observed in groups II

and III and groups I and IV, respectively. The mean concentration of formylkynurenine differed statistically significantly in the small intestine in groups II and IV. See Table 2. Statistically significant differences were observed in the mean DEPPD concentration in the serum after 12 h between group IV and groups I and II. The analysis of the concentration of this compound in the liver after 7 days of the experiment showed statistically significant differences in groups I and II compared to groups III and IV. Differences in the average DEPPD concentration were also observed in the pectoral muscle after 12 h of the experiment in groups III and IV compared to groups I and II. Statistically significant differences in the DEPPD concentration in the heart were observed after 12 h between groups I and IV and after 7 days between groups II and IV. Statistically significant differences were observed in the small intestine after 7 days of the experiment in groups IV and I compared to group III. Statistically significant differences in the DEPPD concentration in the yolk sac after 12 h of the experiment were observed in group I compared to groups III and IV. Statistically significant differences in the DEPPD concentration between the days of analysis (12 h and 7 days) were observed in the liver and small intestine in all experimental groups and in the serum in groups II and IV. Statistically significant differences were also observed between the days of the study in the pectoral muscle in groups I and II and in the heart in groups I–III (Table 2).

4. Discussion

During the 21 days of development of the chicken embryo, intensive metabolic changes take place, determining normal growth and development during the embryonic period [43]. Particular importance is ascribed to changes in lipid metabolism during the final period of embryonic development, which lead to the development of oxidative stress [44–46]. The multi-strain probiotic used in our experiment contains a mixture of useful beneficial microorganisms, including *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. Wang et al. [47] and Hou et al. [48], in a study using pig and mouse models, showed that bacteria of the genus *Lactobacillus* increase SOD activity in the intestines, thereby reducing the ROS concentration and oxidative stress. *Lactobacillus* cells have also been shown to be able to survive in the presence of the hydrogen peroxide they produce, inhibiting the growth of pathogenic microbes [49]. Owing to this property, in ovo administration of *Lactobacillus* bacteria curbs oxidative stress in chicks after they hatch and during their further development.

Our study showed high SOD activity in the small and large intestines of chicks at 12 h post-hatch in the groups supplemented with a multi-strain probiotic and in the small intestine and yolk sac of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly. In the case of CAT, high activity of this enzyme was noted at 12 h post-hatch in the small intestine of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly (group III) and Zn-Gly (group IV) in ovo. An analogous result was obtained for the large intestine of birds receiving the multi-strain probiotic (group II) or Zn-Gly (group IV) in ovo. These results indicate oxidative stress induced by irritation of the intestinal epithelium by the microbes contained in the multi-strain probiotic and by absorption of highly bioavailable zinc chelate. Therefore, the higher SOD activity shown in the intestines post-hatch can be regarded as the effect of these bacteria. It should be noted that at 7 days of age, the SOD activity in the intestines of chicks receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly in ovo was higher than that in the control group. Given the lack of change in SOD activity in the other organs and in the serum, this phenomenon should be linked to local SOD production in the intestines as a result of the irritant effect of zinc glycine chelate on the enterocytes or changes in the intestinal microbiome induced by probiotic and environmental microbes. This is also confirmed by the absence of changes in catalase activity in the intestines.

Analysis of SOD activity in the serum showed an increase at 12 h post-hatch in the group of birds supplemented with a multi-strain probiotic and Zn-Gly. Our results pertaining to this antioxidant enzyme are in contrast to those reported by Shokrane et al. [46], who showed that in ovo feeding with 500 µg of nano-ZnO on day 17 of embryonic development increases the SOD activity in the serum and its antioxidant activity and

reduces oxidative stress in broiler chicks after hatching. These discrepancies may be associated with different means of in ovo administration of Zn, differences in the Zn concentrations in the incubated eggs, and the use of different zinc compounds with different chemical and physical properties than sulfates and oxides. Interesting results were obtained at 7 days of age, when the SOD activity in the liver was significantly higher only in the control group, which suggests activation of this enzyme in response to oxidative stress.

The literature data indicate that zinc plays an important role in the development of the type Th1 immune response, essential to controlling infections through the secretion of a cascade of pro-inflammatory cytokines stimulating immunocompetent effector cells [32,33,50]. This is confirmed by the results of the experiment, in which, following in ovo administration of Zn-Gly chelate, we showed a high concentration of TNF- α in the yolk sac, serum and small and large intestines and of IFN- γ in the yolk sac and serum at 12 h post-hatch. At 7 days of age, a higher TNF- α concentration compared to the control and other experimental groups was noted only in the serum and liver. Stimulation of IFN- γ production in the cells and its release into the serum, shown at 12 h post-hatch, are indicative of the stimulation of T lymphocytes, which increase their cytotoxic activity and promote the cellular phenotype of the Th1 response. Similarly, TNF- α induces the cellular phenotype of the Th1 response. A further indication of immune regulation in response to Zn glycine chelate, limiting the potential occurrence of inflammation, is the high serum concentration of IL-10 at 12 h post-hatch. This cytokine modifies the immune response by acting directly on T cells, inhibiting the synthesis of pro-inflammatory cytokines and limiting the type Th1 immune response.

Different results were obtained following in ovo application of the multi-strain probiotic. In this group, a high concentration of IFN- γ was shown only at 12 h post-hatch in the yolk sac and liver. Similarly, the results for TNF- α did not differ statistically between groups or were significantly lower in the serum, small intestine and liver in comparison to the control group. Similar observations were reported by Pender et al. [51], who, following in ovo feeding with a mixture of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium bifidum*), showed reduced expression of INF- γ , IL-4 and IL-13 in the ileum and caecal tonsils, which are involved in regulation of the innate and acquired immune response. Alizadeh et al. [36] demonstrated that in ovo feeding with 1×10^7 CFU lactobacilli at 18 days of incubation increases the mRNA expression of IFN- α , IFN- β , IL-8, IL-13 and IL-18 in the spleen and the mRNA expression of IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 and IL-18 in the bursa of Fabricius. Shehata et al. [52] reported that in ovo feeding with *B. subtilis* (4×10^5 and 4×10^6 CFU), raffinose (2 and 3 mg) or their combination increases the mRNA expression of IL-2 and toll-like receptor-4 in the ileum. These results clearly indicate that in ovo supplementation with probiotics stimulates the humoral and cellular immune response through regulation of the expression of cytokine genes. Our previous research [34] showed that in ovo administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate causes an increase in the expression of KUL01 in monocytes and macrophages in the spleen and serum, which indicates the activation of these cells and the stimulation of the body's defense mechanisms.

The antioxidant potential of cells is evaluated by determining total antioxidant capacity (T-AOC) [53–55], a useful tool for assessing the antioxidant role of various compounds used as diet supplements for poultry. Our results showed that the use of a multi-strain probiotic (group II) and a multi-strain probiotic with ZnGly chelate (group III) increases T-AOC in the small intestinal tissues at 12 h post-hatch, while no changes in T-AOC were shown in the liver or serum. In addition, T-AOC in the muscle tissue and heart was lower in these groups than in the others. These results suggest that despite the in ovo administration of these supplements, the balance of oxidation and antioxidant processes was not disturbed, and there was no inflammation associated with oxidative stress.

The significant increase in T-AOC shown in the intestinal tissue in the groups of birds receiving a multi-strain probiotic and Zn-Gly in ovo indicates that the probiotic exerts a significant antioxidant effect on rapidly dividing enterocytes during growth and

development. The high T-AOC in the yolk sac in all experimental groups indicates that the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate create antioxidant defense mechanisms together with antioxidant substances and antioxidant enzymes contained in the egg.

One of the important metabolic consequences of in ovo injection of a multi-strain probiotic and Zn-Gly was a reduction in the corticosterone concentration in the yolk sac and serum at 12 h post-hatch and in the serum and liver at 7 days of age. Owing to the antioxidant activity of both supplements, free radicals can be effectively scavenged following in ovo administration, and the chicken embryo is less vulnerable to oxidative damage. What is surprising is the high corticosterone concentration in the serum, small intestine and yolk sac at 12 h post-hatch in the groups receiving Zn-Gly. Contrasting results were obtained by Shokrane et al. [46], who found that chickens subjected to heat stress following in ovo administration of nano-zinc oxide had low corticosterone concentrations despite the increased antioxidant activity of the preparation. The low concentration of glucocorticoids obtained by the researchers was associated with a high total protein concentration in the blood, which was confirmed by Kucuk et al. [56]. In our experiment, however, the protein concentration in the serum and tissues was lower than or comparable to the level in the control group.

Various stress factors responsible for oxidative tissue damage induce the release of ROS, Hsp70 and corticosterone [57]. Hsp70 levels have been shown to be dependent on the stress response and to increase in order to protect cells against its effects [58]. Our study showed a high Hsp70 concentration at 12 h post-hatch in the small intestine of birds in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate in ovo (group III). In the large intestine and serum at 12 h post-hatch and at 7 days of age, the Hsp70 concentration was significantly higher in the group of birds that had received Zn-Gly chelate in ovo (group IV). Contrasting results were reported by Li et al. [59], who showed that zinc can impair the heat shock response in broilers by reducing the mRNA expression of HSP70. Zhang et al. [60], on the other hand, showed that the correct concentration of zinc in mother hens or its additional intake translates to the content of zinc in the eggs, thus reducing concentrations of ROS and HSP70 in the liver of chicken embryos during oxidative stress, while zinc itself plays an antioxidant role by inhibiting the activity of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). The authors also showed that the addition of Zn-Gly, due to better absorption and utilization of zinc, mitigates the effects of oxidative stress more effectively than inorganic forms [60,61]. In the present study, the higher Hsp70 concentrations in groups III and IV, especially in the intestines, indicate that zinc administered in ovo in combination with glycine is accumulated in excess in the intestinal tissue, leading to metabolic changes in the enterocytes and inducing a stress response as a consequence of rapid cell proliferation. The in ovo application of a multi-strain probiotic also causes the microbes supplied in this manner to interact with microorganisms of the intestinal microbiome and colonize the intestine from the moment of hatching, which can also cause temporary oxidative stress reactions in epithelial cells. Mahmoud et al. [57], in broilers given ascorbic acid, showed a relationship between the synthesis of HSP70 and lipid oxidation in cells subjected to stress. Our results pertaining to concentrations of Hsp70, corticosterone and fatty acid peroxidation products (hydroperoxides/DEPPD) in the serum and tissues suggest that in ovo application of Zn-Gly chelate leads to a temporary stress reaction in newly hatched chicks as an effect of highly bioavailable, easily absorbed zinc in organic form. It is worth mentioning the regulatory role of Hsp70 in the body, manifested as the ability to inhibit inflammation, protecting the organism against debilitating chronic stress [62]. This effect can also be seen in our experiment, in which the concentration of Hsp70 at 7 days of age in chicks that had received the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate in ovo is comparable to or lower than that in the control group. The analysis of the concentration of -SH groups included in this study made it possible to determine the intensity of oxidative protein damage in the chicks. The high concentration of -SH groups in the liver, small intestine and pectoral muscle in the experimental groups at 12 h post-hatch indicates that in ovo application of a multi-strain probiotic and Zn-Gly provides strong antioxidant defense,

protecting the embryo and newly hatched chick from harmful external and internal factors. In contrast, a low concentration of SH groups at 12 h post-hatch was noted in the yolk sac and serum in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly (group III) and in the serum in the group receiving Zn-Gly (group IV). These results are indicative of oxidative stress, which may have already occurred in the final stage of embryo development before hatching, when the embryo utilizes the last energy resources of the yolk and intensifies catabolic processes [63]. Alternatively, oxidative stress can result from the hatching process itself, which intensifies it and increases the body's mobilization to survive this stage and adapt to the surrounding environmental conditions. During this period, proteins used for survival during the "hatch window", when the newly hatched chick does not yet receive feed, may disintegrate [64]. A higher concentration of -SH groups in the yolk sac was noted only in the group receiving Zn-Gly, which confirms the importance of highly bioavailable zinc in the form of chelates for protein synthesis. On the other hand, at 7 days of age, the concentration of -SH groups in the serum, pectoral muscles, small intestine, liver and heart of poultry that had received the multi-strain probiotic and Zn-Gly in ovo was similar to the level in the control group, which indicates the absence of processes damaging proteins and the maintenance of relative homeostasis of metabolic processes.

It has been demonstrated that the concentration of bityrosine can be used as a marker of disturbances in oxidation processes [65]. We noted a high concentration of bityrosine at 12 h post-hatch in the yolk sac, serum, heart and small intestine of birds that had received the multi-strain probiotic in ovo. It should be emphasized that in the liver of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly, the concentration of bityrosine was lower than that in the control group, which is indicative of efficient antioxidant processes in cells and maintenance of homeostasis of the redox system. Similarly, we showed a higher concentration of formylkynurenine, a product of tryptophan oxidation, at 12 h post-hatch in the yolk sac in all experimental groups and in the small intestine in the group of birds receiving the multi-strain probiotic in ovo. The increase in harmful products of tryptophan metabolism intensifies oxidative stress, which can lead to a strong inflammatory reaction [66]. However, these changes were not observed in the intestine at 7 days, when the concentration of formylkynurenine in the experimental groups was lower than or similar to the level in the control group. Analysis of these relationships should take into account the fact that intensive enterocyte division and apoptosis with the remodeling of structural proteins take place in the intestines, which is linked to the development of birds, resulting in protein damage and ROS generation. The local nature of these changes is evidenced by the low concentration of formylkynurenine in the liver at 12 h post-hatch.

To assess the extent of damage to cell membranes, we used an indirect method, involving the monitoring of a persistent radical cation formed in the reaction of alkoxy and peroxy radicals derived from hydroperoxides with a suitable additive such as DEPPD [67]. The analysis of the results indicated that at 12 h post-hatch, lipid peroxidation is increased in the serum and heart of birds receiving Zn-Gly chelate in ovo and in the pectoral muscle of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly (group III) or Zn-Gly (group IV). This may be due to oxidation processes associated with the body's response to intensive growth. It is interesting that no increase in lipid peroxidation was shown in the intestines in the experimental groups; furthermore, in the liver of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly in ovo (group III and IV), the intensity of this process was reduced at 7 days post-hatch. The results indicate that a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate applied in ovo have no irritant effect and do not induce inflammation in the intestines, protecting cells against damage.

5. Conclusions

In ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate increases total antioxidant capacity (T-AOC) and the activity of SOD and CAT. At the same time, the release of pro- and anti-inflammatory cytokines, i.e., TNF- α , IFN- γ and IL-10, indicates the stimulating effects of multi-strain probiotics and Zn-Gly chelate on cellular and humoral

immune mechanisms and on processes maintaining the Th1/Th2 balance in chicks during the post-hatch period and the first few days of life. In ovo administration of Zn-Gly chelate can induce a local stress response in the intestines, manifested as increased lipid peroxidation and protein oxidation. The results of our research suggest that the combined in ovo administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate protects developing embryos and newly hatched chicks against oxidative stress, but this should be confirmed by studies using a challenger. An additional advantage of the use of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate, whose beneficial effects were demonstrated in our study, is that the production cost of this mixture is relatively low. However, the feasibility of the routine use of the preparation is limited by the labor-intensive and time-consuming in ovo administration. Further research on the effects of multi-strain probiotics and zinc glycine chelates on metabolic processes taking place in cells at the level of the nucleus and cytosol will help to elucidate unknown aspects of antioxidant protection.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12111905/s1>, Supplementary Table S1: Comparison of the concentrations of IL-10, IFN- γ , TNF- α , corticosterone and Hsp 70 and the mean activity of catalase and superoxide dismutase (SOD) in chicken serum and tissues.

Author Contributions: Conceptualization, A.C. and Ł.S.J.; methodology, A.C., Ł.S.J. and A.B.; software, A.R.; validation, A.C. and A.M.; formal analysis, A.C. and Ł.S.J.; investigation, A.C. and Ł.S.J.; resources, A.B. and A.R.; data curation, B.S.; writing—original draft preparation, A.C. and Ł.S.J.; writing—review and editing, A.C., Ł.S.J. and A.M.; visualization, A.R.; supervision, Z.G.; project administration, Ł.S.J. and Z.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Life Sciences in Lublin, Poland, project No. SD/77/WET/2023.

Institutional Review Board Statement: All procedures involving animals were in compliance with the ethical standards of the institution at which the experiment was conducted. All procedures used during the research were approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval No. 106/2022 of 17 October 2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article and are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria, educational grants, participation in speakers' bureaus, membership, employment, consultancies, stock ownership or other equity interest, expert testimony or patent-licensing arrangements) or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

1. Elson, H. Poultry welfare in intensive and extensive production systems. *World's Poult. Sci. J.* **2015**, *71*, 449–460. [CrossRef]
2. Lukić, M.; Petričević, V.; Delić, N.; Tolimir, N.; Dosković, V.; Rakonjac, S.; Škrbić, Z. How does the choice of genotype and feed in the local market affect broiler performance and the farm economy? A case study in Serbia. *Agriculture* **2022**, *12*, 843. [CrossRef]
3. Deeming, D.C.; Pike, T.W. Embryonic growth and antioxidant provision in avian eggs. *Biol. Lett.* **2013**, *9*, 20130757. [CrossRef] [PubMed]
4. Yang, S.; Lian, G. ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Mol. Cell. Biochem.* **2020**, *467*, 1–12. [CrossRef]
5. Surai, P.F.; Fisinin, V.I.; Karadas, F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* **2016**, *2*, 1–11. [CrossRef]
6. Surai, P.F.; Speake, B.K.; Noble, R.C.; Sparks, N.H. Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biol. Trace Elem. Res.* **1999**, *68*, 63–78. [CrossRef]
7. Surai, P.F. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *Br. Poult. Sci.* **1999**, *40*, 397–405. [CrossRef]
8. Surai, P.F. Vitamin E in avian reproduction. *Poult. Avian Biol. Rev.* **1999**, *10*, 1–60.

9. Surai, P.F. Effect of the selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *Br. Poult. Sci.* **2000**, *41*, 235–243. [\[CrossRef\]](#)
10. Surai, P.F. Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: From the past to the future. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2014**, *98*, 19–31. [\[CrossRef\]](#)
11. Surai, P.F. Antioxidant action of carnitine: Molecular mechanisms and practical applications. *EC Vet. Sci.* **2015**, *2*, 66–84.
12. Karadas, F.; Surai, P.F.; Sparks, N.H. Changes in broiler chick tissue concentrations of lipid-soluble antioxidants immediately post-hatch. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2011**, *160*, 68–71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Speake, B.K.; Murray, A.M.; Noble, R.C. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 1–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Yang, J.; Ding, X.; Bai, S.; Wang, J.; Zeng, Q.; Peng, H.; Xuan, Y.; Su, Z.; Zhang, K. The effects of broiler breeder dietary vitamin E and egg storage time on the quality of eggs and newly hatched chicks. *Animals* **2020**, *10*, 1409. [\[CrossRef\]](#)
15. Matsue, H.; Edelbaum, D.; Shalhevet, D.; Mizumoto, N.; Yang, C.; Mummert, M.E.; Oeda, J.; Masayasu, H.; Takashima, A. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 3010–3018. [\[CrossRef\]](#)
16. Arai, T.; Yamada, H.; Namba, T.; Mori, H.; Ishii, H.; Yamashita, K.; Sasada, M.; Makino, K.; Fukuda, K. Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpirtin on T cell functions. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1185–1193. [\[CrossRef\]](#)
17. Zhou, R.; Yazdi, A.S.; Menu, P.; Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **2011**, *469*, 221–225. [\[CrossRef\]](#)
18. Malheiro, R.D.; Ferket, P.R.; Goncalves, F.M. Oxidative stress protection of embryos by “In ovo” supplementation. In Proceedings of the World’s Poultry Congress Salvador, Bahia, Brazil, 5–9 August 2012.
19. Lee, S.H.; Lillehoj, H.S.; Jang, S.I.; Jeong, M.S.; Xu, S.Z.; Kim, J.B.; Park, H.J.; Kim, H.R.; Lillehoj, E.P.; Bravo, D.M. Effects of in ovo injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 1113–1121. [\[CrossRef\]](#)
20. Yigit, A.; Panda, A.; Cherian, G. The avian embryo and its antioxidant defense system. *World’s Poult. Sci. J.* **2014**, *70*, 563–574. [\[CrossRef\]](#)
21. Wilson, K.M.; Rodrigues, D.R.; Briggs, W.N.; Duff, A.F.; Chasser, K.M.; Bielke, L.R. Evaluation of the impact of in ovo administered bacteria on microbiome of chicks through 10 days of age. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 5949–5960. [\[CrossRef\]](#)
22. Wang, Y.; Wu, Y.; Wang, Y.; Xu, H.; Mei, X.; Yu, D.; Wang, Y.; Li, W. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* **2017**, *9*, 521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Das, R.; Mishra, P.; Jha, R. In ovo feeding as a tool for improving performance and gut health of poultry: A review. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 754246. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Shehata, A.M.; Paswan, V.K.; Attia, Y.A.; Abdel-Moneim, A.E.; Abougabal, M.S.; Sharaf, M.; Elmazoudy, R.; Alghafari, W.T.; Osman, M.A.; Farag, M.R.; et al. Managing gut microbiota through in ovo nutrition influences early-life programming in broiler chickens. *Animals* **2021**, *11*, 3491. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Mishra, B.; Jha, R. Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 60. [\[CrossRef\]](#)
26. Atsbeha, A.T.; Hailu, T.G. The impact of effective microorganisms (EM) on egg quality and laying performance of chickens. *Int. J. Food Sci.* **2021**, *2021*, 8895717. [\[CrossRef\]](#)
27. Esatu, W.; Melesse, A.; Dessie, T. Effect of effective microorganisms on growth parameters and serum cholesterol levels in broilers. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6*, 3841–3846.
28. Chen, X.; He, C.; Zhang, K.; Wang, J.; Ding, X.; Zeng, Q.; Peng, H.; Bai, J.; Lv, L.; Xuan, Y.; et al. Comparison of zinc bioavailability in zinc-glycine and zinc-methionine chelates for broilers fed with a corn-soybean meal diet. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 983954. [\[CrossRef\]](#)
29. Huang, Y.L.; Lu, L.; Li, S.F.; Luo, X.G.; Liu, B. Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 2038–2046. [\[CrossRef\]](#)
30. Star, L.; van der Klis, J.D.; Rapp, C.; Ward, T.L. Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 3115–3120. [\[CrossRef\]](#)
31. Jarosz, Ł.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Kwiecień, M.; Żylinska, B.; Kaczmarek, B. Effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulfate on cytokine and immunoglobulin gene expression profiles in chicken intestinal tissue. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 4224–4235. [\[CrossRef\]](#)
32. Jarosz, Ł.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Kwiecień, M.; Kalinowski, M. The effect of feed supplementation with zinc chelate and zinc sulphate on selected humoral and cell-mediated immune parameters and cytokine concentration in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *112*, 59–65. [\[CrossRef\]](#)
33. Jarosz, Ł.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Laskowska, E.; Kwiecień, M. Effect of zinc sulfate and zinc glycine chelate on concentrations of acute phase proteins in chicken serum and liver tissue. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *187*, 258–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ciszewski, A.; Jarosz, Ł.; Marek, A.; Michalak, K.; Grądzki, Z.; Kaczmarek, B.; Rysiak, A. Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, 102823. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Weese, J.S.; Martin, H. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. *Can. Vet. J.* **2011**, *52*, 43–46. [\[PubMed\]](#)

36. Alizadeh, M.; Bavananthasivam, J.; Shojadoost, B.; Astill, J.; Taha-Abdelaziz, K.; Alqazlan, N.; Boodhoo, N.; Doost, J.S.; Sharif, S. In ovo and oral administration of probiotic Lactobacilli modulate cell- and antibody-mediated immune responses in newly hatched chicks. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 664387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Alizadeh, M.; Astill, J.; Alqazlan, N.; Shojadoost, B.; Taha-Abdelaziz, K.; Bavananthasivam, J.; Doost, J.S.; Sedeghiisfahani, N.; Sharif, S. In ovo co-administration of vitamins (A and D) and probiotic lactobacilli modulates immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 101717. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [\[CrossRef\]](#)
39. Katalinic, V.; Modun, D.; Music, I.; Boban, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *140*, 47–52. [\[CrossRef\]](#)
40. Gornal, A.G.; Bardawill, C.J.; David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret method reaction. *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751–766. [\[CrossRef\]](#)
41. Rice-Evans, C.A.; Diplock, A.T.; Symons, M.C.R. *Techniques in Free Radical Research*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1991.
42. Alberti, A.; Bolognini, L.; Macciantelli, D.; Caratelli, M. The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.* **2000**, *26*, 253–267. [\[CrossRef\]](#)
43. Givisiez, P.E.N.; Moreira Filho, A.L.B.; Santos, M.R.B.; Oliveira, H.B.; Ferket, P.R.; Oliveira, C.J.B.; Malheiros, R.D. Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 6774–6782. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Dennerly, P.A. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **2007**, *81*, 155–162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Cherian, G. Nutrition and metabolism in poultry: Role of lipids in early diet. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Shokraneh, M.; Sadeghi, A.A.; Mousavi, S.N.; Esmaeilkhani, S.; Chamani, M. Effects of in ovo injection of nano-selenium and nano-zinc oxide and high eggshell temperature during late incubation on antioxidant activity, thyroid and gluco-corticoid hormones and some blood metabolites in broiler hatchlings. *Acta Sci.-Anim. Sci.* **2020**, *42*, e46029. [\[CrossRef\]](#)
47. Wang, J.; Ji, H.F.; Wang, S.X.; Zhang, D.Y.; Liu, H.; Shan, D.C.; Wang, Y.M. *Lactobacillus plantarum* ZLP001: In vitro assessment of antioxidant capacity and effect on growth performance and antioxidant status in weaning piglets. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2012**, *25*, 1153–1158. [\[CrossRef\]](#)
48. Hou, C.L.; Zhang, J.; Liu, X.T.; Liu, H.; Zeng, X.F.; Qiao, S.Y. Superoxide dismutase recombinant *Lactobacillus fermentum* ameliorates intestinal oxidative stress through inhibiting NF-κB activation in a trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis mouse model. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 1621–1631. [\[CrossRef\]](#)
49. Reis, J.A.; Paula, A.T.; Casarotti, S.N.; Penna, A.L.B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Eng. Rev.* **2012**, *4*, 124–140. [\[CrossRef\]](#)
50. Hojyo, S.; Fukada, T. Roles of zinc signaling in the immune system. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 6762343. [\[CrossRef\]](#)
51. Pender, C.M.; Kim, S.; Potter, T.D.; Ritz, M.M.; Young, M.; Dalloul, R.A. In ovo supplementation of probiotics and its effect on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 1052–1062. [\[CrossRef\]](#)
52. Shehata, A.M.; Paswan, V.K.; Attia, Y.A.; Abougabal, M.S.; Khamis, T.; Alqosaibi, A.I.; Alnamshan, M.M.; Elmazoudy, R.; Abaza, M.A.; Salama, E.A.A.; et al. In ovo inoculation of *Bacillus subtilis* and raffinose affects growth performance, cecal microbiota, volatile fatty acid, ileal morphology and gene expression, and sustainability of broiler chickens (*Gallus gallus*). *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 903847. [\[CrossRef\]](#)
53. Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 1106–1114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Hegde, M.N.; Hegde, N.D.; Ashok, A.; Shetty, S. Evaluation of total antioxidant capacity of saliva and serum in caries-free and caries-active adults: An in-vivo study. *Indian J. Dent. Res.* **2013**, *24*, 164–167. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Peluso, I.; Roguzzini, A. Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Pathol. Res. Int.* **2016**, *2016*, 5480267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Kucuk, O.; Sahin, N.; Sahin, K. Supplemental zinc and vitamin A can alleviate negative effects of heat stress in broiler chickens. *Biol. Trace Elem. Res.* **2003**, *94*, 225–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Mahmoud, K.Z.; Edens, F.W.; Eisen, E.J.; Havenstein, G.B. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *137*, 35–42. [\[CrossRef\]](#)
58. Miao, Q.; Si, X.; Xie, Y.; Chen, L.; Liu, Z.; Liu, L.; Tang, X.; Zhang, H. Effects of acute heat stress at different ambient temperature on hepatic redox status in broilers. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 4113–4122. [\[CrossRef\]](#)
59. Li, T.; He, W.; Liao, X.; Lin, X.; Zhang, L.; Lu, L.; Guo, Y.; Liu, Z.; Luo, X. Zinc alleviates the heat stress of primary cultured hepatocytes of broiler embryos via enhancing the antioxidant ability and attenuating the heat shock responses. *Anim. Nutr.* **2021**, *7*, 621–630. [\[CrossRef\]](#)

60. Zhang, Y.; Xie, L.; Ding, X.; Wang, Y.; Xu, Y.; Li, D.; Liang, S.; Wang, Y.; Zhang, L.; Fu, A.; et al. Mechanisms underlying the protective effect of maternal zinc (ZnSO₄ or Zn-Gly) against heat stress-induced oxidative stress in chicken embryo. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1699. [[CrossRef](#)]
61. Yu, Y.; Lu, L.; Li, S.F.; Zhang, L.Y.; Luo, X.G. Organic zinc absorption by the intestine of broilers in vivo. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117*, 1086–1094. [[CrossRef](#)]
62. Yang, P.C.; Tu, Y.H.; Perdue, M.H.; Oluwole, C.; Struiksma, S. Regulatory effect of heat shock protein 70 in stress-induced rat intestinal epithelial barrier dysfunction. *N. Am. J. Med. Sci.* **2009**, *1*, 9–15.
63. Guérin, P.; El Mouatassim, S.; Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **2001**, *7*, 175–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Li, D.L.; Wang, J.S.; Liu, L.J.; Li, K.; Xu, Y.B.; Ding, X.Q.; Wang, Y.Y.; Zhang, Y.F.; Xie, L.Y.; Liang, S.; et al. Effects of early post-hatch feeding on the growth performance, hormone secretion, intestinal morphology, and intestinal microbiota structure in broilers. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 102133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gatin, A.; Billault, I.; Duchambon, P.; van der Rest, G.; Sicard-Roselli, C. Oxidative radicals (HO• or N₃•) induce several di-tyrosine bridge isomers at the protein scale. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *162*, 461–470. [[CrossRef](#)]
66. Hajsl, M.; Hlavackova, A.; Broulikova, K.; Sramek, M.; Maly, M.; Dyr, J.E.; Suttner, J. Tryptophan metabolism, inflammation, and oxidative stress in patients with neurovascular disease. *Metabolites* **2020**, *10*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Bielecka, A.; Jamioł, M.; Kankofer, M. Antioxidative and oxidative profiles in plasma and saliva in dairy cows during pregnancy. *Animals* **2021**, *11*, 3204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Table S1: Comparison of the concentrations of IL-10, IFN- γ , TNF- α , corticosterone, and Hsp 70, and the mean activity of catalase and superoxide dismutase (SOD) in chicken serum and tissues.

Parameters	Group	N =	12 hours					7 days				
			Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	
Corticosterone ng/ml	I		0.85±0.41***	2.24±0.62***	3.05±0.13**	2.45±0.25***	1.13±0.29**	1.03±0.33***	2.20±1.04**	1.86±0.24	1.67±0.56**	
	II	30	0.19±0.01***	0.47±0.10***	2.54±0.46**	3.17±0.77***	0.38±0.25**	0.8±0.27***	0.43±0.24**	1.86±0.50	1.12±0.24**	
	III		0.56±0.40***	8.38±2.45***	3.60±0.30**	4.12±0.24***	0.89±0.07**	0.34±0.16***	1.53±0.14**	2.22±0.07	1.47±0.60**	
	IV		1.32±0.14***	2.55±0.26***	3.73±0.21**	0.82±0.28***	1.37±0.55**	2.54±0.37***	1.08±0.37**	3.41±1.65	2.08±0.63**	
SOD U/ml	I		0.034±0.0049*	0.327±0.0237	0.1±0.0006***	0.102±0.0107**	0.372±0.0087***	0.039±0.0023	0.323±0.0165***	0.049±0.0039***	0.155±0.0261**	
	II	30	0.033±0.002*	0.334±0.0112	0.159±0.0112***	0.17±0.0097**	0.474±0.0531***	0.041±0.0051	0.219±0.0033***	0.123±0.0052***	0.155±0.0189**	
	III		0.038±0.0011*	0.344±0.0151	0.135±0.0142***	0.115±0.0053**	0.337±0.0217***	0.040±0.0014	0.237±0.0072***	0.11±0.0051***	0.121±0.0238**	
	IV		0.034±0.0025*	0.306±0.0344	0.066±0.011***	0.137±0.0307**	0.309±0.0306***	0.042±0.0008	0.233±0.0117***	0.114±0.018***	0.089±0.0203**	
Catalase μ M/min/ml	I		21.14±5.66	414.91±9.10*	142.9±70.71*	148.73±3.66**	415.45±11.10*	18.83±4.28**	425.63±11.99**	420.86±4.33***	380.12±31.69**	
	II	30	18.53±3.58	423.39±9.93*	129.08±27.32*	286.13±113.01**	420.89±5.16*	67.11±6.28***	422.51±5.05**	406.63±3.06***	423.90±5.65**	
	III		12.96±1.04	407.62±3.39*	263.39±57.99*	162.62±58.83**	411.85±3.59*	9.85±0.52***	413.08±5.22**	226.15±69.65***	334.62±16.63	
	IV		15.83±7.08	422.9±70*	186.9±26.84*	379.73±25.73**	415.45±11.10*	25.74±2.63***	414.8±1.98**	410.64±4.43***	381.09±47.07	
Hsp70 ng/ml	I		1.66±0.74**	5.39±0.24***	1.16±0.05**	2.89±0.23***	20.06±4.36	4.33±0.26	4.69±0.15***	4.79±0.15***	4.76±0.28**	
	II	30	1.8±1.01**	4.57±0.27***	2.18±1.17**	1.43±0.74***	24.34±2.38	3.9±0.49	4.3±0.08***	4.43±0.35***	4.44±0.39**	
	III		4.38±0.28**	4.36±0.16***	3.86±0.19**	1.31±0.05***	25±1.20	2.72±0.28	4.60±0.11***	4.69±0.2***	4.03±0.05**	
	IV		7.58±4.12**	5.23±0.25***	2.73±0.22**	4.39±0.16***	24.22±1.53	5.27±0.19	5.51±0.37***	4.76±0.07***	5.07±0.32**	
TNF- α ng/ml	I		56.73±4.90**	550.2±106.76***	132.87±26.70***	66.35±8.56	52.41±10.06***	20.27±2.09***	204.23±46.52***	81.56±30.69	117.72±13.49**	
	II	30	30.76±4.89**	356.34±23.12***	61.54±11.50***	123.5±16.06	60.14±7.14***	6.76±0.89***	253.08±44.32***	102.13±4.30	101.48±43.84**	
	III		19.69±3.43**	319.96±29.16***	72.67±9.29***	85.08±8.10	41.7±14.90***	16.32±1.73**	343.97±22.48***	106.55±20.18	181.5±16.24***	
	IV		75.13±10.89**	259.55±79.18***	128.65±24.72***	195.68±19.1	93.84±39.19***	72.37±10.56***	371.58±69.12***	98.33±36.45	110.35±45.11**	

IL-10 pg/ml	I	1521.42±546.46*	7407.56±176.91***	110.7±54.99***	67.84±17.08***	832.22±357.25	145.34±85.59	7046.02±667.56*	853.59±444.08*	1242.18±356.25**
	II	1386.39±680.52*	7483.41±289.48***	217.88±70.55***	96.96±21.9***	975.73±534.26	75.2±7.79	7435.1±320.29*	1083.95±525.65*	1752.28±57.94**
	III	516.19±208.23*	4586.4±134.03***	424.24±157.14***	129.41±29.9***	463.41±36.41	121.26±97.74	6650.28±255.04*	627.9±54.88*	2468.45±531.25**
	IV	1786.3±571.19*	3504.83±2327.4***	55.45±24.65***	402.92±49.79***	1197.24±71.54	215.9±123.76	7115.58±185.92*	1605.8±392.85*	1266.58±129.41**
INF γ pg/ml	I	2122.28±620.21**	2551.24±709.07***	144.67±8.49***	103.84±38.32***	64.83±15.23***	25.26±6.08***	2429.4±280.1***	467.7±111.08**	509.9±65.11**
	II	1293.09±842.93**	4183.56±232.94***	88.73±13.73***	37.84±10.17***	226.25±55.48***	11.82±1.57***	2841.97±58.9***	424.03±7.75**	381.61±72.66**
	III	367.73±191.37**	1470.88±207.9***	41.11±4.2***	96.11±29.73***	89.28±17.89***	92.14±64.37***	2280.03±213.1***	376.04±23.69**	519.96±163.62**
	IV	2591.68±775.47**	2728.03±510.74***	141.4±19.49***	195.15±37.25***	285.59±77.69***	304.65±43.61***	3305.02±111.75***	282.48±74.27**	835.91±84**

Values are expressed as mean and standard deviation (±SD). One-way ANOVA and the Mann-Whitney U test were used to show the statistical significance of differences in the serum and tissues of broiler chickens at 12 hours after hatching and at 7 days of age. Level of statistical significance: * – p < 0.05, ** – p < 0.001, *** – p < 0.0001. Lower-case letters (a, b, c) indicate differences shown in Kruskal-Wallis ANOVA and post-hoc tests. The same letter designations indicate no statistically significant differences. Significant differences in the Mann-Whitney U test between groups at the analysis times are shown in bold. I - control group – eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1 × 10⁸ CFU *S. cerevisiae*, 1 × 10⁷ CFU *L. casei*, and 1 × 10⁷ CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1 × 10⁵ CFU *S. cerevisiae*, 1 × 10⁷ CFU *L. casei*, and 1 × 10⁷ CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). SD - standard deviation. N - number of samples of serum, liver, pectoral muscle, heart, small intestine and yolk sac, tested in each group at 12 hours after hatching and at 7 days of age.



Article

Proteome and Peptidome Changes and Zn Concentration in Chicken after In Ovo Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zn-Gly Chelate: Preliminary Research

Artur Ciszewski ¹, Łukasz S. Jarosz ^{1,*}, Katarzyna Michalak ¹, Agnieszka Marek ², Zbigniew Grądzki ¹, Jacek Wawrzykowski ³, Bartłomiej Szymczak ⁴ and Anna Rysiak ⁵

- ¹ Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; artur.ciszewski@up.lublin.pl (A.C.); zespollukasza@gmail.com (K.M.)
 - ² Sub-Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Biological Bases of Animal Diseases, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; agnieszka.marek@up.lublin.pl
 - ³ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland
 - ⁴ Sub-Department of Pathophysiology, Department of Preclinical of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; bartlomiej.szymczak@up.lublin.pl
 - ⁵ Department of Botany, Mycology, and Ecology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland; anrysiak@o2.pl
- * Correspondence: lukasz.jarosz@up.lublin.pl; Tel.: +48-53-468-0690



Citation: Ciszewski, A.; Jarosz, Ł.S.; Michalak, K.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Wawrzykowski, J.; Szymczak, B.; Rysiak, A. Proteome and Peptidome Changes and Zn Concentration in Chicken after In Ovo Stimulation with a Multi-Strain Probiotic and Zn-Gly Chelate: Preliminary Research. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, *46*, 1259–1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>

Academic Editor: Madhav Bhatia

Received: 29 December 2023

Revised: 26 January 2024

Accepted: 29 January 2024

Published: 1 February 2024



Copyright: © 2024 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of the study was to determine differences in the proteome and peptidome and zinc concentrations in the serum and tissues of chickens supplemented with a multi-strain probiotic and/or zinc glycine chelate in ovo. A total of 1400 fertilized broiler eggs (Ross × Ross 708) were divided into four groups: a control and experimental groups injected with a multi-strain probiotic, with zinc glycine chelate, and with the multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. The proteome and peptidome were analyzed using SDS-PAGE and MALDI—TOF MS, and the zinc concentration was determined by flame atomic absorption spectrometry. We showed that in ovo supplementation with zinc glycine chelate increased the Zn concentration in the serum and yolk sac at 12 h post-hatch. The results of SDS-PAGE and western blot confirmed the presence of Cu/Zn SOD in the liver and in the small and large intestines at 12 h and at 7 days after hatching in all groups. Analysis of the MALDI—TOF MS spectra of chicken tissues showed in all experimental groups the expression of proteins and peptides that regulate immune response, metabolic processes, growth, development, and reproduction.

Keywords: chicken; in ovo; multi-strain probiotic; zinc glycine chelate; MALDI—TOF MS

1. Introduction

Intensive breeding of highly productive chickens brings many problems that can threaten the health and welfare of birds. As a result, animal husbandry becomes less efficient. Promoting sustainable poultry production can minimize these negative effects [1–4]. A proven way to improve the performance of broiler chickens, product quality, and health is to optimize nutrition [5,6]. Studies have shown the importance not only of appropriate feeding of birds from hatching to slaughter, but especially of in ovo feeding [7].

Among various bioactive substances administered in ovo, increasing importance is currently ascribed to multi-strain probiotic and organic forms of mineral compounds, specifically chelates [8–10]. Among multi-strain probiotics, formulations containing effective microorganisms (EM) are particularly worthy of attention [11]. Supplementation

of poultry feed with EMs has been shown to stimulate immunity in chickens [11] and contribute to the synthesis of various biologically active compounds, including enzymes and vitamins [12]. These processes increase daily weight gains, improve feed digestibility, increase productivity, and reduce mortality [13,14]. The use of EM probiotics as feed additives also increases intestinal assimilation of elements by creating an acidic environment in the gut [15]. Combined supplementation with a multi-strain probiotic and an easily assimilated element in chelated form guarantees a more efficient impact on the body [11]. In addition, supplementation with probiotics, including multi-strain probiotics, during embryonic development has been shown not only to modify the composition of the microbiome of the developing and newly hatched chick, but also to influence metabolism during post-hatch development [16].

In addition to probiotics, organic chelated forms of elements are increasingly used in the diet of broiler chickens. These include Zn-Gly chelate, administered mainly due to the high bioavailability of Zn in combination with glycine [17,18]. Zn-Gly has been shown to have direct or indirect impact on birds, e.g., by modifying the immune response [19,20] or stimulating growth and development [21]. Literature data also confirm the beneficial effect of zinc on metabolic processes in animal tissues [22]. Moreover, zinc also influences the fatty acid profile and regulates transport of intestinal lipids and the metabolism of prostaglandins [23,24]. Additional in ovo administration of zinc increases its concentration and resorption by the embryo, which positively affects health and production parameters in the post-hatch period [25]. Zn absorbed by the embryo accumulates mainly in the liver and takes part in building the tissues of the developing chick [26,27].

It is also worth noting that the gastrointestinal tract (GIT) microbiota and processes regulating the expression of genes responsible for metabolism undergo modulation in early embryonic development [28]. In ovo supplementation with a multi-strain probiotic and Zn chelate during this period may contribute to embryonic programming, affecting the entire body during the post-hatch period. Moreover, modulation of the bacterial microbiota of chicks in the embryonic stage influences amino acid transporters and ion transporters, which are associated with various bacterial strains making up the intestinal microbiome of broilers [29]. Microorganisms that constitute the microbiome and probiotic supplemented in ovo and in vivo can influence the metabolism of minerals such as calcium, iron, magnesium, selenium, potassium, copper, zinc, and others by increasing or inhibiting their absorption through the digestive tract [30]. This happens through interactions between microorganisms, minerals, and host cells [31]. In particular, probiotics increase the bioaccessibility and bioavailability of Zn by influencing the expression of specific proteins involved in the transport of Zn through the intestinal wall [30]. Examples of such interactions include increasing the level of metallothionein in enterocytes through the production of short-chain fatty acid (SCFA), which lowers intestinal pH and increases the solubility of Zn, or the biotransformation of inorganic Zn to its organic form by specific probiotic strains [32]. Therefore, supplementation with probiotics may result in increased Zn absorption and its accumulation in the body.

Changes in the microbiome through in ovo supplementation may also lead to metabolic changes, which may also influence the growth of chicks after hatching. The beneficial effect of probiotics and zinc on health and production parameters in chickens is undoubtedly related to changes in the number and activity of specific proteins involved in immune and metabolic processes. Zn²⁺ is known to affect the proteolytic activity of transthyretin (TTR) and may cause structural changes in this protein and thus in its stability and aggregation [33]. Therefore, high Zn intake in feed may, on the one hand, stimulate overall hepatocyte metabolism when TTR is synthesized, while, on the other hand, it may cause pathological changes leading to the development of diseases involving TTR [33]. An increased supply of zinc in the body also leads to an increase in the concentration of metallothionein (MT) in the liver and the activation of many enzymes, e.g., glutamate dehydrogenase (GDH), which is involved in the Krebs cycle [34]. Data in the available literature indicate that the use of various forms of zinc as a supplement causes an increase

in the expression of genes in the liver that participate in the response to oxidative stress, as well as an increase in the activity of antioxidant enzymes and a reduction in lipid peroxidation processes [35,36]. These data clearly confirm the beneficial effect of zinc on metabolic processes in hepatocytes. Simultaneously, probiotic microbes can facilitate absorption of microelements such as Zn [30], so understanding these relationships in quantitative and qualitative terms will create the basis for a rational approach to effective poultry feeding using dietary supplements and in ovo technology. The aim of the study was to determine differences in the proteome and peptidome and zinc concentrations in the serum and tissues of chickens which have received a multi-strain probiotic and/or Zn-Gly chelate in ovo. Presumably, these analytical methods will not only enable visualization of the proteome and peptidome of chicken tissues, but may also reveal any differences in protein expression depending on the time of analysis and the use of in ovo supplements. The results can serve as a basis for further research involving the identification of specific proteins differentiating various groups and their post-translational modifications, which will make it possible to learn which proteins appear in the body or undergo increased synthesis as a result of the use of these supplements.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Statement

The experiment was conducted at the Experimental Station of the Poznań University of Life Sciences, Gorzyń 4, Międzychód commune. Consent for all research procedures was obtained from the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval no. 106/2022 of 17 October 2022).

2.2. Incubation Period

Hatching eggs were collected from Ross × Ross 708 broilers at the age of 36 weeks (15th week of laying) and transported to the Experimental Station of the Poznań University of Life Sciences. Eggs were stored at 21 °C for 24 h before being incubated. After they were weighed and labelled, the eggs were disinfected with Viron FF (glutaraldehyde, didecyltrimethylammonium chloride, quaternary ammonium compounds, and benzyl-C12-C16-alkyldimethyl; DDD-1, Bielsko Biała, Poland) in 1 mL of L-1 solution and then placed in JARSON Model JD-18 incubators (Gostyń, Poland) at 37.8 °C and a relative humidity of 55–60% (days 1–18). On the 19th day of incubation (DOI), the eggs were transferred to a hatching chamber (JARSON Model ATLAS-180, Gostyń, Poland). Relative humidity was maintained at 60–65% for the last three days of incubation (19–21 DOI). Eggs were candled at 7 and 17 DOI, and unfertilized and dead embryonic eggs were discarded.

2.3. In Ovo Inoculations

At 17 DOI, 1400 fertilized eggs of similar weight were divided randomly into four groups, with 10 replicates per group and 35 eggs per replicate (350 eggs per group). The four groups were as follows: eggs injected with sterile 0.9% physiological saline solution—control group I (Zn-Gly-Prob-); eggs injected with a multi-strain probiotic (EM Provet; Greenland EM Technology, Janowiec, Poland)—group II (Prob+); eggs injected with zinc glycine chelate (ARKOP Sp. z o.o., Bukowno, Poland)—group III (Zn-Gly+); and eggs injected with the multi-strain probiotic and zinc glycine chelate—group IV (Zn-Gly+Prob+). The multi-strain probiotic was in the form of a powder. One gram of multi-strain probiotic contains the following strains: *Saccharomyces cerevisiae* (Y200007) 5×10^6 CFU, *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) 5×10^8 CFU, and *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 5×10^8 CFU. The multi-strain probiotic was dissolved in PBS, and 100 µL of this dilution contains 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, and 1×10^7 CFU *L. plantarum*. Zn-Gly powder (250 mg Zn-Gly per g of product) was dissolved in deionized water. The resulting solutions contained 100 µg Zn-Gly/100 µL MQ water. All procedures are described in Ciszewski et al. [11].

Prior to inoculation, at 17 DOI, all eggs were decontaminated with 75% ethanol, and within 30 min, all eggs were inoculated through the air chamber (using a 2.5 cm-long 23G needle) with 500 µL of 0.9% saline or a bioactive compound to the amniotic sac. The puncture sites in the eggs were sealed with paraffin. The eggs were then placed in an incubator. All in ovo methods are described by Alizadeh et al. [37].

2.4. Birds and Housing

One day after hatching, 150 chicks were selected from each group (10 replicates of 15 birds per replicate from each group). The experimental period was 7 days. The birds were fed a basic starter S mixture (1–7 days) in the form of crumble according to nutritional recommendations for broiler chickens by Ross 308 (Aviagen, Broiler Nutrition Specifications, <https://aviagen.com/eu/brands/ross/products/ross-308>, accessed on 12 September 2022). No bioactive compounds, coccidiostats, or antibiotics were added to the diet. The content of nutrients in the feed was calculated from the chemical composition of the feed ingredients and the metabolic energy value. Composition and nutrient value of basal diet (%) are described in detail in work by Ciszewski et al. [11]. The chickens were kept under controlled conditions as recommended for this line. They were reared on wood chips in aviaries with controlled temperature and humidity, with access to feeding lines and nipple drinkers. The light intensity was 30 lux with a 22L:2D photoperiod. The temperature was kept at 31–33 °C and the relative humidity was kept at 60% ± 10%.

2.5. Blood and Tissue Sample Collection

Blood and tissues were sampled from three birds per replicate (30 samples in total) in each group. The samples were not pooled. Blood samples were collected at 12 h post-hatch from chicks sacrificed by decapitation (before feeding) and again at 7 days post-hatch. Blood was collected into tubes with a clotting activator (Medlab Products, Raszyn, Poland) and transported to the laboratory within 1 h. Then, the samples were centrifuged at room temperature (20–22 °C) for 15 min at 1000× g, and the serum was stored at −80 °C.

At the same time as the blood collection, i.e., at 12 h and 7 days post-hatch, tissues from the liver, small intestine (ileum), and large intestine (between the cloaca and the entrance to the caecum) were collected for analysis of zinc concentrations and proteomic analysis. The yolk sac was collected only at 12 h after hatching for analysis of zinc concentrations and proteomic analysis. Decapitation was performed according to the procedures described in the AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (<https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>, accessed on 12 September 2022) [38]. The tissue samples were collected by dissection immediately after decapitation of the birds. After collecting the tissues were washed in ice-cold saline (87 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0.5 mM CaCl₂, 7 mM MgSO₄, 25 mM glucose, 75 mM sucrose, pH 7.4) and stored at −80 °C for further analysis.

2.6. Determination of the Zinc Concentration in Serum and Tissues by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS)

The Zn concentration was determined 12 h after hatching and 7 days after hatching in samples of the liver, small intestine (ileum), and serum of the birds in the control (I) and experimental (II–IV) groups. The Zn concentration was also determined at 17 days of incubation and 12 h after hatching in the yolk sac in all groups. Samples of 0.5 g were weighed out to within 1 mg and subjected to wet mineralization with concentrated nitric acid (HNO₃) in a closed-loop microwave system using a CEM Mars Xpress digestion oven (Matthews, NC, USA). The following parameters were used in the mineralization process: magnetron power (W)—800, temperature rise time (minutes)—25, temperature (°C)—210, and time of temperature maintenance (minutes)—15. The zinc concentration was determined by atomic absorption spectrometry using a Varian SpektrAA 280FS spectrometer with an SPS-3 autosampler and SIPS diluter (Belrose, Australia), with an air-acetylene flame. Validation parameters are presented in Table 1.

Table 1. Validation parameters used in the Zn assay.

Element/Method	Zn/FAAS ¹
Flame/assay technique	acetylene/air/absorption
Wavelength [nm]	213.9
Slit width [nm]	1.0
Lamp current [mA]	5.0
LOD—limit of detection [mg/kg]	0.4
LOQ—limit of quantitation [mg/kg]	0.9
Precision (coefficient of variation) (%)	5.1
Recovery of the CRM (%)	106
Expanded uncertainty [%]	14

¹ FAAS: flame atomic absorption spectrometry.

2.7. MALDI—TOF MS

Tissue homogenates were obtained by short homogenization on ice with the addition of a protease inhibitor cocktail (Mass Spectrometry Safe Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, Poznań, Poland). Homogenates were centrifuged (5000× *g*, 20 min, 4 °C), and supernatants were collected. Tissue homogenates were purified and concentrated by ZipTip with 0.6 µL C18 resin using 100% acetonitrile (ACN) as the wetting solution and 0.1 TFA/50% ACN for elution. Eluted samples were spotted on an Anchor Chip MALDI plate (Bruker, Bremen, Germany) and covered with 1 µL of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (HCCA, Bruker, Bremen, Germany). Simultaneously, a standard solution (Peptide Calibration Standard II, Bruker, Bremen, Germany) was applied to the calibration spots. Mass spectra were recorded using an Ultraflex extreme MALDI TOF/TOF (Bruker, Bremen, Germany) spectrometer with linear mode for molecular weights greater than 5000 Da (parameters as follows: linear detector gain: 26×2998 V, frequency: 1000 Hz, 2 GS/s, and mass range: 4000 to 20,000 *m/z*) and reflector mode for lower molecular weights (parameters as follows: reflector detector gain: 8.8×2531 V, frequency: 1000 Hz, 4 GS/s, and mass range: 700 to 4000 *m/z*). All spectra were smoothed and baseline corrected in flexAnalysis 3.0 software (Bruker, Bremen, Germany). The peptide and protein masses shown on the spectra were compared with each other and with UniProt biodata resource (<https://www.uniprot.org>, accessed on 8 November 2023).

2.8. SDS-PAGE Analysis

SDS-PAGE electrophoresis was conducted by a standard procedure by Laemmli [39]. The procedure was carried out in a 10% resolving gel (Tris–HCl buffer with pH 8.8), and 4% polyacrylamide in Tris–HCl buffer with pH 6.8 was used as a stacking gel and Tris–glycine running chamber buffer. Separation took place at a constant current of 100 mA. Additionally, a molecular weight standard (Perfect TM Color Protein Ladder, EurX, Gdańsk, Poland) with a molecular weight range from 7 to 240 kDa was used during separation. Gels were stained with Coomassie blue (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) and silver. The stained gels were scanned by ImageScanner III LabScan 6.0 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

2.9. Statistical Analysis

The data were analyzed with the Shapiro–Wilk test using Statistica 13.2 PL software (StatSoft, Kraków, Poland) to check the normality of the distribution, which was not normal in several cases. A Box–Cox transformation of the data was therefore performed to obtain a normalized distribution and a homogeneous variance. The results were expressed as the arithmetic mean and standard deviation (SD). Parametric tests were used to demonstrate the significance of statistical differences ($p < 0.05$) between the control group (group I) and the experimental groups (groups II–IV) using two-way ANOVA and post hoc Tukey tests. The *t* test was used to test differences within the same group over time, i.e., at 12 h and at 7 days after hatching. A two-factor analysis of variance modelling approach was used to study the effect of two factors on the average Zn levels in serum and selected tissues of

chickens. Four study groups were established: group I—control (Prob-, Zn-Gly-); group II (Prob+); group III (Zn-Gly+); and group IV (Zn-Gly+Prob+), in which the interaction effects between the two factors were statistically analyzed. The measure of the effect was the coefficient η^2 (eta), which determines the proportion of the total variance explained by the analyzed factors (fix effect of the model). This was calculated using the following formula:

$$\eta^2 = SS_{\text{efekt}} / SS_{\text{total}} \times 100\%,$$

where SS_{efekt} —sum of squares of standard deviations associated with the effect and SS_{total} —total sum of squares for the effects + SS_{error} .

The results were presented in graphic form, with the same letter designations indicating the absence of statistically significant differences. Capital letters were used to show statistically significant results between groups in time (t test), and lower-case letters to indicate differences shown in ANOVA and post hoc tests.

The volumes of SOD bands were expressed as arithmetic mean and standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test were performed to demonstrate the significance of statistical differences ($p \leq 0.05$). Student's t test ($p \leq 0.05$) was used to analyze the differences in the average volume of the band in a given organ between 12 h and 7 days (e.g., liver 12 h group I versus liver 7 days group I).

3. Results

3.1. Zn Concentration in the Serum, Liver, Small Intestine, and Yolk Sac

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the effect of and interaction between the two in ovo supplements, zinc-glycine chelate (Zn-Gly) and the multi-strain probiotic, and their effect on zinc levels in the tissues (Table 2).

Table 2. Effect of the main factors and their interactions on zinc level in serum and studied tissues [mg/kg] at 12 h and 7 days after hatching.

Effect	Serum		Liver		Small Intestine		Yolk Sac
	12 h	7 Days	12 h	7 Days	12 h	7 Days	12 h
Prob+ (group II)	1.57 ± 0.20 F = 2.75 $p = 0.11$ $\eta^2 = 0.12\%$	2.99 ± 0.31 F = 25.74 $p < 0.001$ $\eta^2 = 56.27\%$	18.40 ± 2.35 F = 9.42 $p < 0.001$ $\eta^2 = 29.4\%$	22.8 ± 0.53 F = 0.0 $p = 0.77$ $\eta^2 = 0.44\%$	23.63 ± 2.83 F = 0.10 $p = 0.76$ $\eta^2 = 0.47\%$	27.35 ± 0.33 F = 8.40 $p < 0.001$ $\eta^2 = 8.32\%$	14.98 ± 1.59 F = 0.50 $p = 0.49$ $\eta^2 = 0.31\%$
Zn-Gly+ (group III)	2.20 ± 0.30 F = 1375.24 $p < 0.001$ $\eta^2 = 60.11\%$	2.93 ± 0.22 F = 0.25 $p = 0.63$ $\eta^2 = 1.22\%$	21.00 ± 3.43 F = 1.78 $p = 0.2$ $\eta^2 = 5.50\%$	34.73 ± 7.14 F = 131 $p < 0.001$ $\eta^2 = 86.77\%$	24.67 ± 2.33 F = 0.29 $p = 0.59$ $\eta^2 = 1.39\%$	24.85 ± 1.56 F = 58.64 $p < 0.001$ $\eta^2 = 61.62\%$	32.82 ± 4.76 F = 94.43 $p < 0.001$ $\eta^2 = 60.34\%$
Zn-Gly+Prob+ (group IV)	13.88 ± 1.69 F = 889.93 $p < 0.001$ $\eta^2 = 38.90\%$	2.58 ± 0.26 F = 1.23 $p = 0.29$ $\eta^2 = 5.78\%$	23.30 ± 2.28 F = 1.03 $p = 0.32$ $\eta^2 = 3.2\%$	30.85 ± 0.56 F = 3.0 $p = 0.12$ $\eta^2 = 11.77\%$	24.43 ± 2.16 F = 0.28 $p = 0.60$ $\eta^2 = 96.77\%$	24.78 ± 1.09 F = 8.13 $p < 0.001$ $\eta^2 = 8.54\%$	25.12 ± 2.82 F = 41.56 $p < 0.001$ $\eta^2 = 12.78\%$

Results of the two-way analysis of variance (ANOVA). Zn-Gly+, zinc-glycine chelate; Prob+, multi-strain probiotic; Zn-Gly+Prob+, interaction zinc-glycine chelate and multi-strain probiotic; η^2 , correlation ratio; F, ratio of variance; p , significance level.

Statistically significant differences in plasma zinc concentration 12 h after hatching ($p \leq 0.05$) were observed between group III and other experimental groups. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in zinc concentration were also observed between groups I (control) and II and IV. After 7 days from hatching, a statistically significant difference ($p \leq 0.05$) in zinc concentration was observed in group I compared to groups II and IV. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in serum zinc levels were also observed in all groups between 12 h and 7 days after hatching (Figure 1).

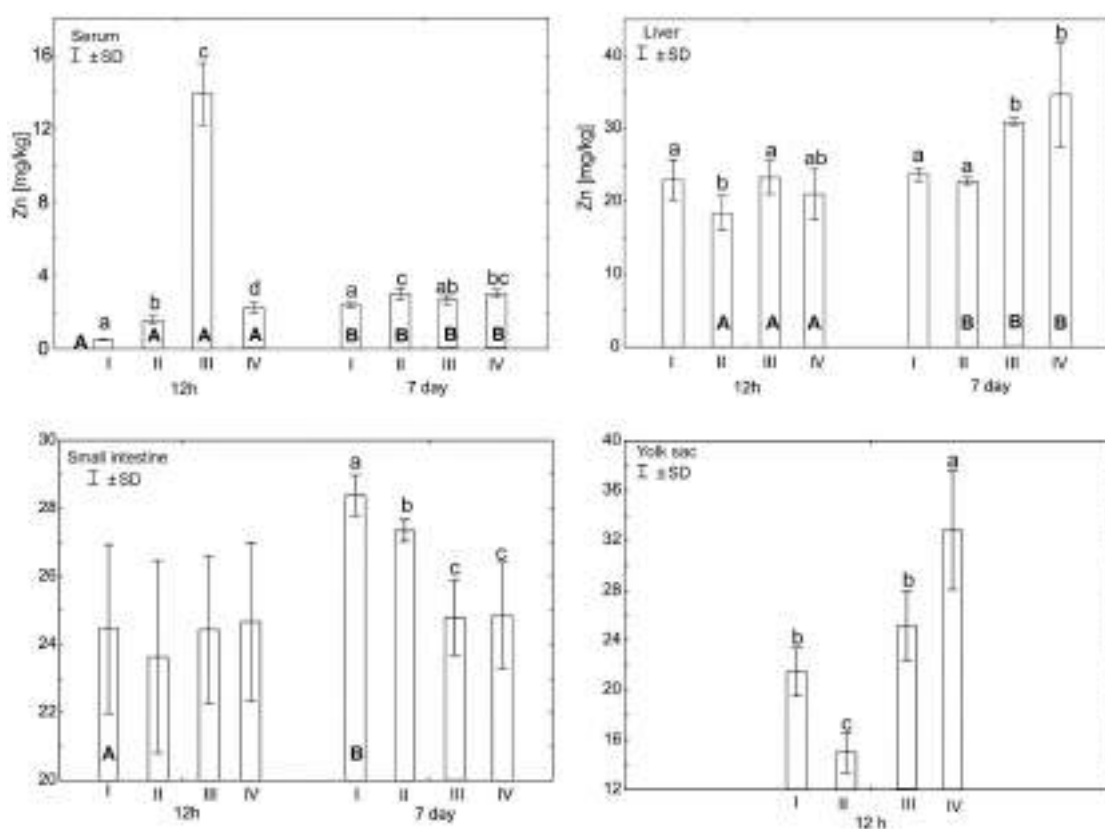


Figure 1. Comparison of zinc concentration (mean $\pm$ SD) for the tissues examined during two periods: 12 h and 7 days after hatching (capital letters—A, B) according to the *t* test ($p \leq 0.05$) and between four experimental groups at the same time: group I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate (lower-case letters—a, b, c, d). Different letters indicate statistically significant differences using two-way analysis of variance (ANOVA).

Statistically significant differences in zinc content in the liver 12 h after hatching ($p \leq 0.05$) were observed in group II compared to group III and group I. However, after 7 days from hatching, statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in the level of the tested microelement were observed in groups IV and III in relation to groups II and I. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in the level of zinc were also observed on the seventh day after hatching in groups I–IV, compared to the level of zinc in these groups 12 h after hatching (Figure 1).

Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in zinc content in the small intestine, ileum, were observed 7 days after hatching in group I compared to groups II, III, and IV. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in the level of zinc in the small intestine between the 12th hour after hatching and the seventh day were observed only in group I (Figure 1).

On day 17 of incubation, the average level of Zn in yolk sac, before in ovo supplementation, was 27.8 ± 0.79 mg/kg. Comparing this result with the level of Zn 12 h after hatching, a statistically higher level of zinc was recorded in group IV and was lower in groups I–II. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in the level of zinc in the yolk sac 12 h after hatching were observed in group II compared to groups I, III, and IV. Detailed data are presented in Figure 1.

A two-factor analysis of variance (ANOVA) was also performed, in order to determine the effect and interaction between the two dietary supplements, zinc-glycine chelate (group III, Zn-Gly+) and multi-strain probiotic (group II, Prob+), and their effect on zinc levels in the serum and tissues. This was due to the administration of the supplement mixture to individuals in experimental group IV (Zn-Gly+Prob+) (Figure 1, Tables 2 and S1). For serum 12 h after hatching, the administration of Zn-Gly significantly increased Zn levels. The combination of zinc glycine chelate and multi-strain probiotic (group IV, Zn-Gly+Prob+) significantly decreased zinc levels. After 7 days, a significant effect of increasing Zn levels was observed for the multi-strain probiotic. Both Zn-Gly+ and Zn-Gly+Prob+ did not significantly affect tissue zinc levels in serum. In liver cells, the reduction in Zn levels 12 h after multi-strain probiotic (group II, Prob+) administration was statistically significant. Zn-Gly+ supplementation after 7 days increased Zn levels in liver cells to a similar extent as supplementation with mixtures of Zn-Gly+Prob+. The combination of supplements did not produce statistically significant effects. In small intestine cells, a significant effect of the supplements was not observed until the 7th day after hatching; it was most visible after supplementation with multi-strain probiotic, while the administration of Zn-Gly+ and Zn-Gly+Prob+ significantly reduced zinc levels. A mixture of Zn-Gly+Prob+ supplements significantly improved zinc absorption in the yolk sac, where zinc levels were highest after 12 h compared to other experimental groups. Detailed data are presented in Tables 2 and S1.

3.2. Peptide Profile Analysis

We showed differences between groups by comparing the intensities of mass spectra. MALDI—TOF MS identified 12 proteins (Table 3). The peptide profiles of liver homogenates were checked using a mass spectra range of 600–10,000 Da (Figure 2). The following proteins were identified in the liver peptide profile: FMRFamide-like neuropeptide, with a molecular weight of 645 Da, transthyretin (1117 Da), puromycin-sensitive aminopeptidase isozyme II (2162 Da), and MHC class I antigen (7053 Da) (Table 3). Analysis of the differences within groups at 12 h and 7 days post-hatch revealed the absence of several peptide signals. Molecular weights absent in the group at 7 days were 642 and signals were in the range of 2160–2162 m/z (Figures 2 and 3). Significant differences in the mass spectra of liver homogenate proteins were observed between 12 h and 7 days post-hatch. Ion 8460 m/z in all samples collected 12 h after hatching was clearly more intense than in samples collected at 7 days after hatching. Only the signal ratio of 7052 to 8460 m/z differentiated the samples taken at 12 h after hatching and 7 days after hatching (Figure 2). Comparative analysis of peptide profiles in individual groups at 12 h after hatching revealed new peptides in the groups supplemented with multi-strain probiotic+ZnGly and ZnGly (Figure 3).

Table 3. Protein identification by UniProt Entry according to their molecular weight in chicken tissues.

Protein Name	Weight (Da)	UniProt Entry
Liver		
FMRFamide-like neuropeptide	645	P83308
Transthyretin	1117	Q6LAP1
Puromycin-sensitive aminopeptidase isozyme II	2162	Q9PS17
MHC class I antigen	(7052.50)/7053	Q4ZGL8
Small intestine		
Insulin 2	5067	A0A3G3C4S4
Mitochondrial inner membrane protease subunit 2	11,298	A0A8V0X568
Serglycin	14,070	A0A8V0ZRY6

Table 3. *Cont.*

Protein Name	Weight (Da)	UniProt Entry
Large intestine		
Glutamate—cysteine ligase	8172	A0A8V0X4D6
V-type proton ATPase subunit	9008	Q5ZJC4
Yolk sac		
Protein-serine/threonine phosphatase	8433	A0A3Q2U207
V-type proton ATPase subunit	9002	Q5ZJC4
Epidermal differentiation protein	9152	A0A088BHA8
Prolactin-releasing hormone	9678	A0A1D5PYU4

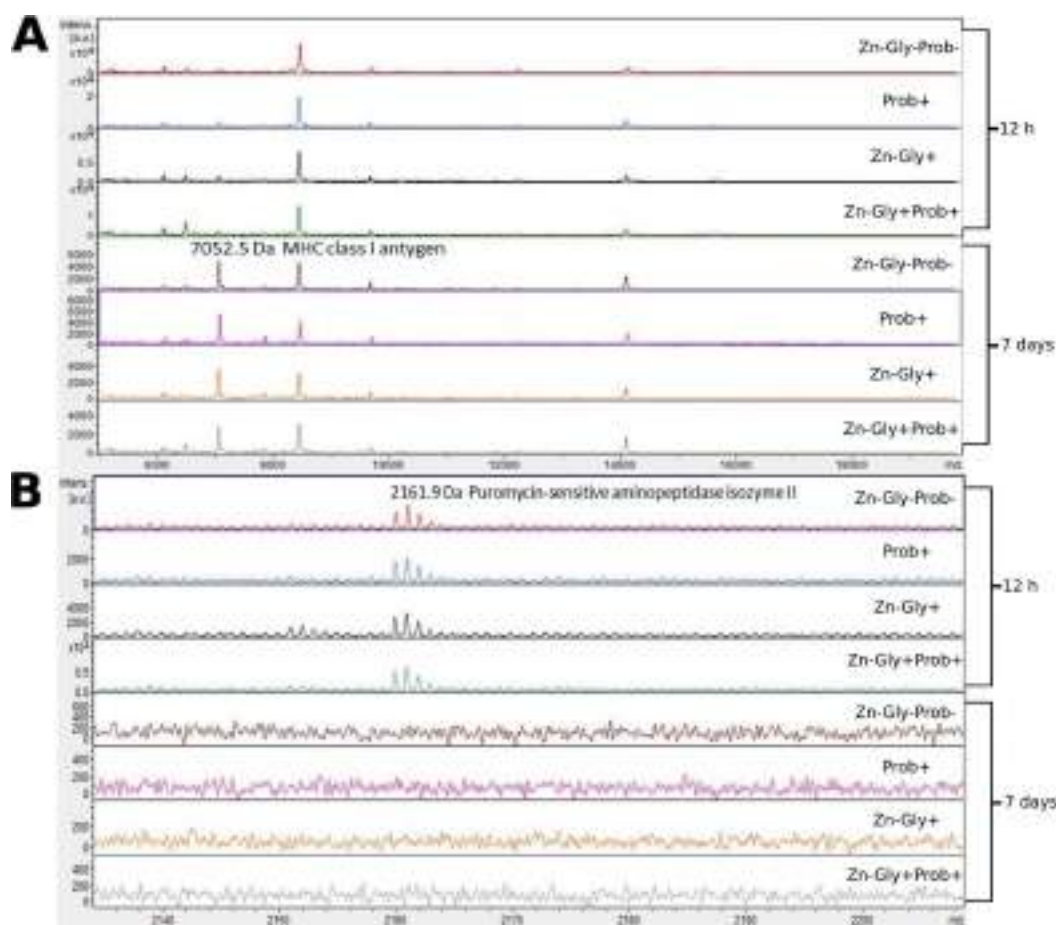


Figure 2. MALDI—TOF MS obtained after enzymatic hydrolysis of the liver of chickens during two periods: 12 h and 7 days after hatching. (A) mass ranges from 6000 to 18,000; (B) mass ranges from 2140 to 2200. Group I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate.

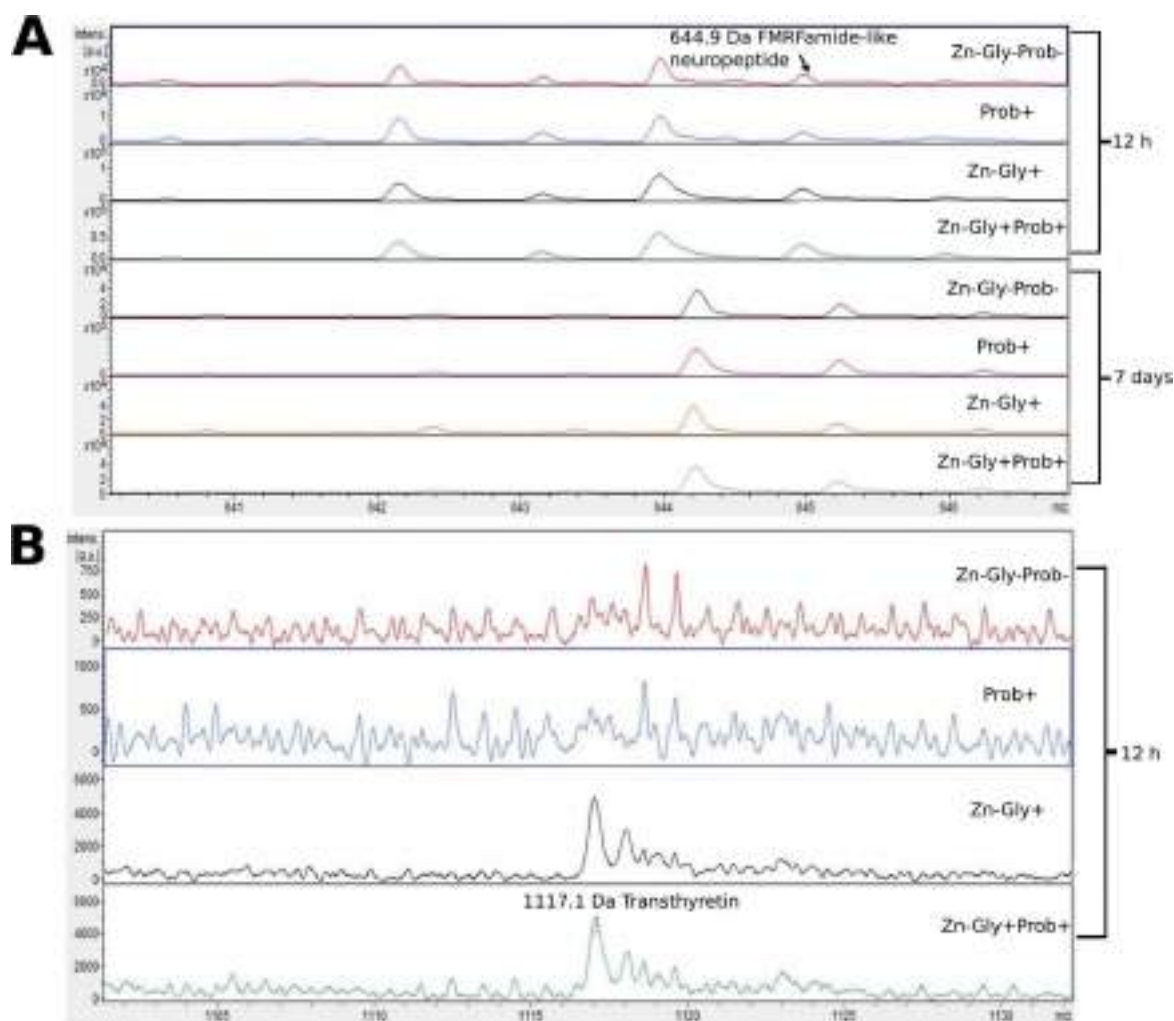


Figure 3. MALDI—TOF MS obtained after enzymatic hydrolysis of the liver of chickens during two periods: 12 h and 7 days after hatching. **(A)** mass ranges from 641 to 645; **(B)** mass ranges from 1105 to 1130. Group I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate.

Three proteins were identified in the small intestine peptide profile: insulin 2, with a molecular weight of 5067 Da, mitochondrial inner membrane protease subunit 2 (11,298 Da), and serglycin (14,070 Da) (Figure 4, Table 3). Analysis of the differences between samples taken at 12 h and 7 days post-hatch revealed the formation of new peptides of 11,300 and 13,875 m/z in all groups except the multi-strain probiotic-supplemented group at 7 days post-hatch (Figure 4). The analysis of molecular weights higher than 5000 m/z showed that at 12 h post-hatch the 5067 m/z signal had disappeared only in the control group, while the 14,070 protein peak was absent in group II, supplemented with the multi-strain probiotic (Figure 4).

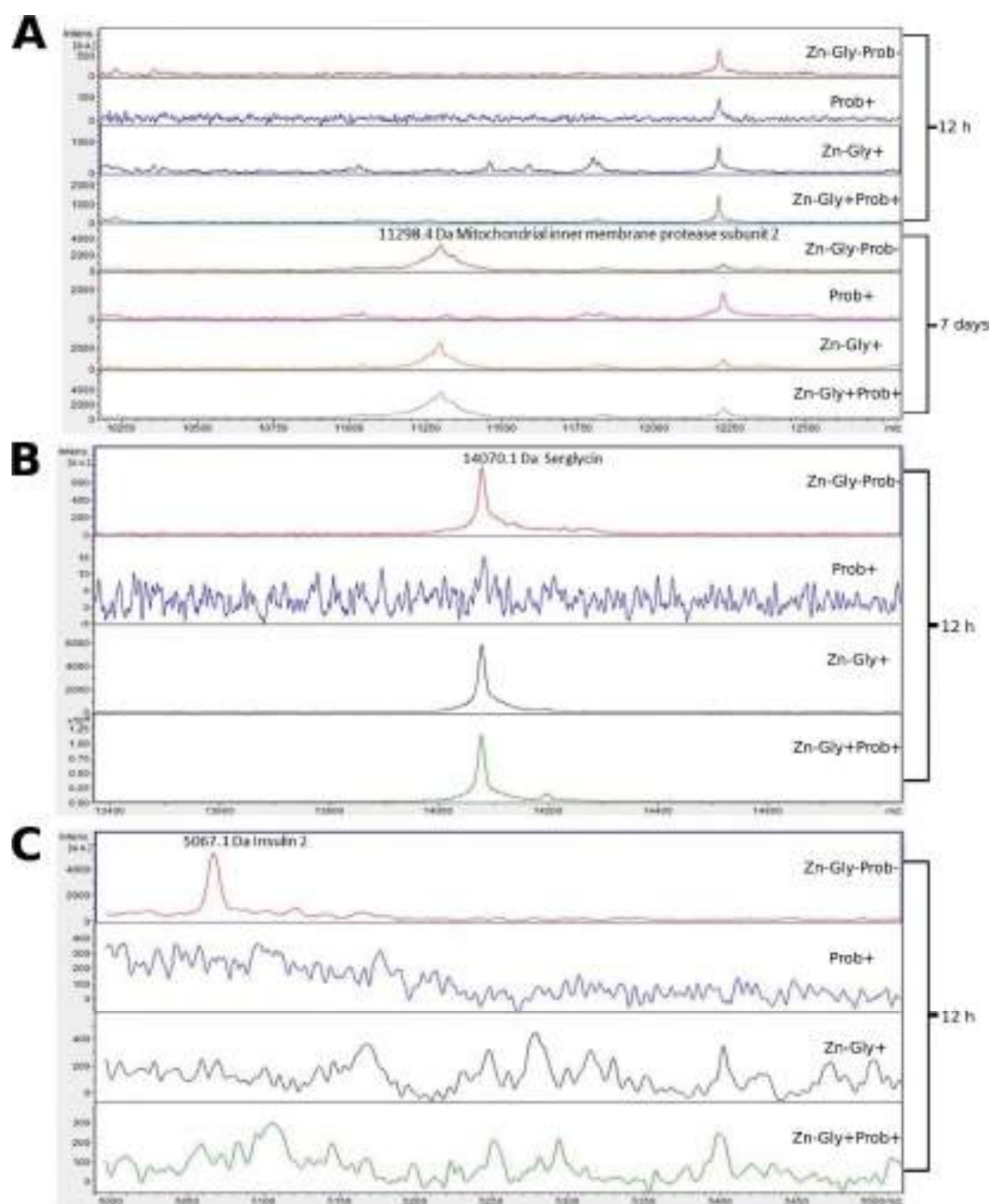


Figure 4. MALDI—TOF MS obtained after enzymatic hydrolysis of the small intestine of chickens during two periods: 12 h and 7 days after hatching. (A) mass ranges from 10,250 to 12,500; (B) mass ranges from 13,400 to 14,600; (C) mass ranges from 5000 to 5500. Group I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate.

Two proteins were identified in the peptide profile of the large intestine: glutamate-cysteine ligase, with a molecular weight of 8172 Da, and V-type proton ATPase subunit, with a molecular weight of 9008 Da (Figure 5, Table 3). Comparison of larger mass spectra showed clear differences around 8172 m/z . This signal was observed at 12 h post-hatch but was absent after 7 days (Figure 5). Differences were also observed in the control group, in which a peak near 9000 m/z was observed in the large intestine samples at 12 h post-hatch, and a low-intensity mass of 11,250 was observed at 7 days post-hatch (Figure 5).

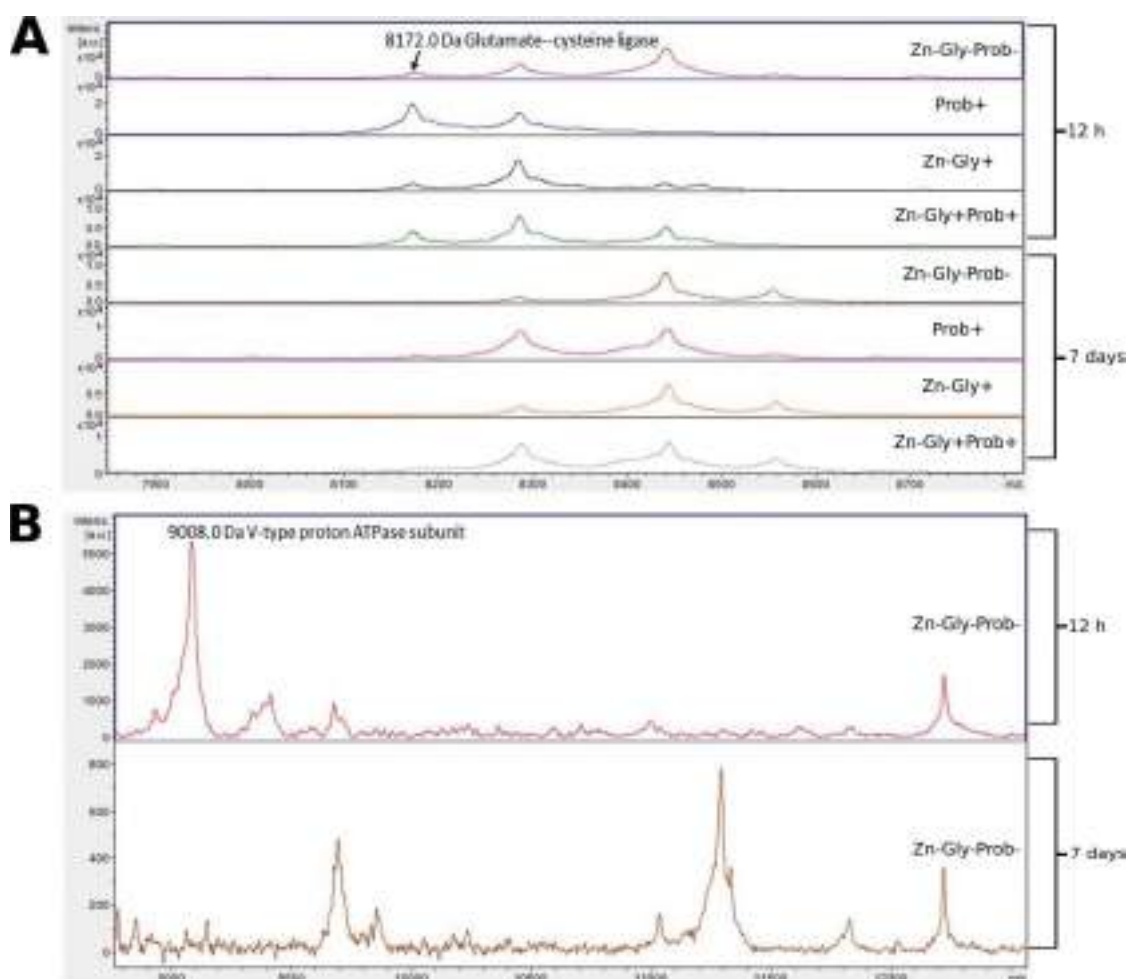


Figure 5. MALDI—TOF MS obtained after enzymatic hydrolysis of the large intestine of chickens during two periods: 12 h and 7 days after hatching. (A) mass ranges from 7900 to 8700; (B) mass ranges from 9000 to 12,000. Group I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate.

Four proteins were identified within the yolk sac: protein-serine/threonine phosphatase with a molecular weight of 8433 Da, V-type proton ATPase subunit (9002 Da), epidermal differentiation protein (9152 Da), and prolactin-releasing hormone (9678 Da) (Figure 6, Table 3).

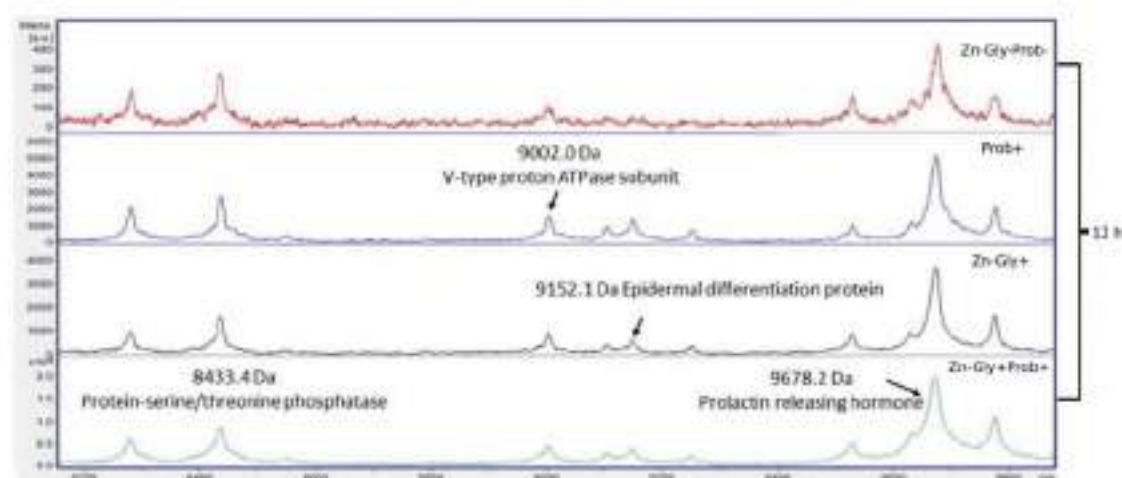


Figure 6. MALDI-TOF MS in the chicken liver tissue 12 h after incubation. Mass ranges from 8200 to 9800. Group I—control group (Zn-Gly+Prob- eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+—eggs injected with a multivitamin product); group III (Zn-Gly+—eggs injected with zinc glycine chelate); group IV (Zn-Gly+Prob+—eggs injected with a multivitamin product and zinc glycine chelate).

3.4. Protein Mass Distribution of Liver Tissue by SDS-PAGE

The SDS-PAGE gels presented the molecular weight distribution of proteins in the tissues in the range of 15–250 kDa. The aim of SDS-PAGE electrophoresis is to analyze protein mass fractions in samples. The gels were stained with both silver and Coomassie brilliant blue to expose as many proteins as possible. Proteins in a range from 25 to 62 kDa made up the largest share of the protein composition. There was also a band of around 13 kDa representing the protein Cu/Zn SOD. This band was not present in the chicken (Figures 7 and S1–S6).

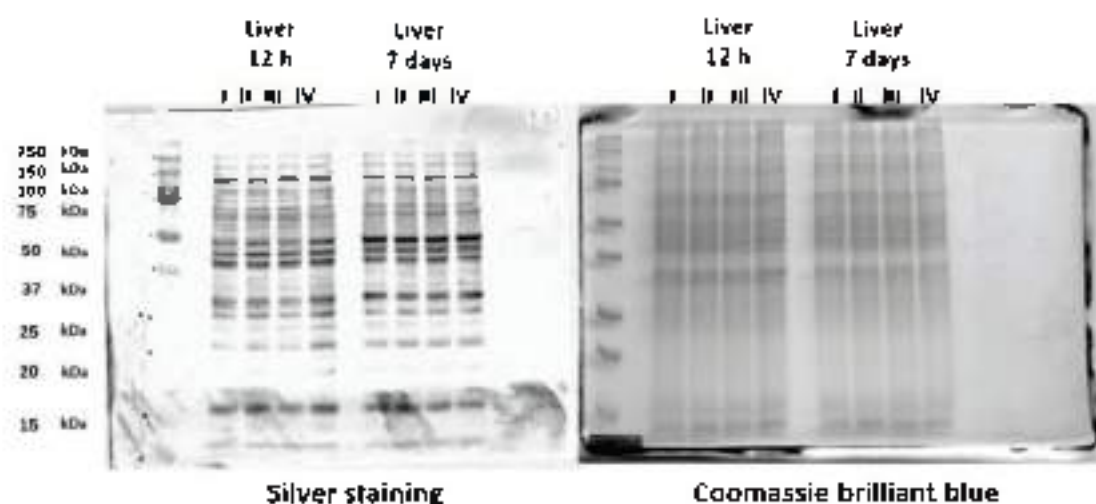


Figure 7. SDS-PAGE of liver gels stained with Coomassie brilliant blue and silver. The gels contain proteins from chicken liver. I—control group (Zn-Gly+Prob- eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+—eggs injected with a multivitamin product); group III (Zn-Gly+—eggs injected with zinc glycine chelate); group IV (Zn-Gly+Prob+—eggs injected with a multivitamin product and zinc glycine chelate).

3.1. Analysis of the Presence of Superoxide Dismutase (SOD) in the Liver and in the Small and Large Intestine

The western blot results confirmed the presence of Cu/Zn SOD in the liver and in the small and large intestine at 12 h and 7 days after hatching in all experimental groups and the control (Figures 8 and 9). Analysis of polyacrylamide gels using Gel Analyzer 1v.1 software showed the highest expression of Cu/Zn SOD in the small and large intestine at 12 h post-hatch in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (group IV) or Zn-Gly chelate (group III). At 7 days of age, however, the highest expression of Cu/Zn SOD was noted in the small intestine in group IV, receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate, and in the large intestine in group III, receiving Zn-Gly chelate (Table 4, Figures 8 and 9).

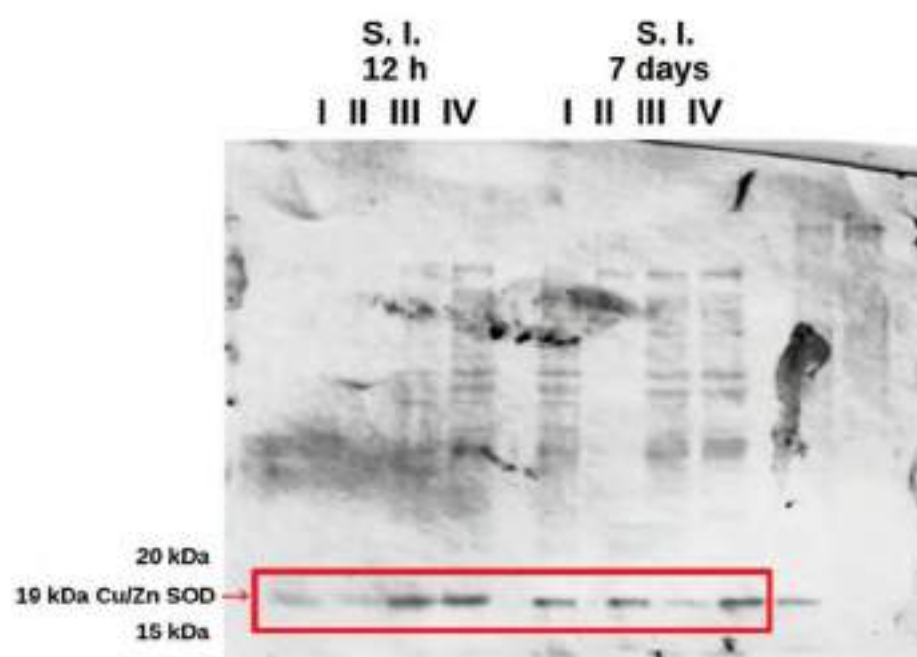


Figure 9. Western blot with SOD band extracted from chicken at all substrate: (I) control group (Zn-Gly-0.6%), eggs injected with 0.9% physiological saline solution; group II (Zn-Gly-0.6%)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly-3%)—eggs injected with zinc-glycine chelate; group IV (Zn-Gly-3%)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate.

Table 4. Mean SOD level determined by western blot—band volume according to Gel Analyzer 1v.1.

Time	Tissue	SOD Band Volume	SOD (+)	Time	Tissue	SOD Band Volume	SOD (+)
Liver				Liver			
12 h	I	95.1	1.32	7 days	I	8.99	3.84
	II	940	4.22		II	751	1.82
	III	964	5.85		III	686	4.06
	IV	1071	6.06		IV	71.6	1.06
Small intestine				Small intestine			
12 h	I	97.7	5.69	7 days	I	926	2.51
	II	644	4.04		II	447	6.24
	III	1979	7.23		III	1362	5.56
	IV	1338	2.16		IV	1245	5.02

Table 4. Cont.

Time	Tissue	SOD Band Volume	SD ($\pm$)	Time	Tissue	SOD Band Volume	SD ($\pm$)
Large intestine				Large intestine			
12 h	I	406	5.09	7 days	I	1672	6.92
	II	297	2.88		II	421	8.01
	III	817	3.50		III	1819	6.10
	IV	911	3.08		IV	976	5.16

SD—standard deviation.

Analysis of the differences in the average volume of the band in a given organ in a given group between 12 h and 7 days (e.g., liver 12 h group I vs. liver 7 days group I), based on Student's *t* test (significance level $p \leq 0.05$) showed statistically significant differences between each pair at $p < 0.00001$ (Table 4).

4. Discussion

The experiment showed that in ovo supplementation with Zn-Gly chelate increased the Zn concentration in the serum and yolk sac at 12 h post-hatch. The Zn concentration was also increased in the yolk sac in the group of birds receiving a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate in ovo. No changes were noted in the Zn concentration in the intestinal tissues or liver of either group of birds. In contrast, Radi et al. [40] and Ramiah et al. [41] showed increased Zn concentrations in the serum, liver, and muscles of broilers fed a diet with zinc oxide nanoparticles (ZONPs); the increase in the concentration was proportional to the level of zinc supplementation.

In the present study, the group of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (groups III and IV) showed increased Zn concentrations in the liver at 7 days of age (Table 2, Figure 1). These results demonstrate that the zinc concentration in the birds remains adequate for normal development and metabolism, while surplus amounts are stored in the liver. The multi-strain probiotic used in our study contains LAB strains, which colonize the digestive tract of birds and become part of the intestinal microbiome. The accumulation of zinc in the body is significantly influenced by strains of lactic acid bacteria (LAB) [42], which enable the transformation of the inorganic forms of minerals into an organic form in which zinc binds to protein complexes and is absorbed in the small intestine in a manner typical of peptides and proteins [42,43]. This can explain the high zinc concentration in the liver of birds additionally receiving a multi-strain probiotic (group IV). The Zn-enriched biomass of the microbiome, containing LAB, supplies the body with significant amounts of this element, essential for meeting all vital needs [42,43].

It is also worth emphasizing that the addition of phytase to feed may affect Zn metabolism and its concentration in the body. There are a lot of conflicting data in the available literature regarding the addition of phytase to feed. Świątkiewicz et al. [44] showed that the administration of phytase in feed containing a Zn supplement in organic form reduces the relative bioavailability of Zn. On the other hand, Yi et al. [45] and Thiel and Weigand [46] showed that the addition of phytase to poultry feed resulted in greater Zn retention and reduced its excretion into the environment. Moreover, Augspurger et al. [47] showed that Zn supplementation in the diet of chickens reduces the effectiveness of phosphorus-releasing phytase, which indicates a strong inhibitory effect of Zn on phytate hydrolysis by phytase. These conflicting data require further detailed investigation at the cellular level. In our experiment, Zn supplementation was not used in the first 7 days of life, and Zn-Gly chelate administered in ovo had a significant impact on the metabolic processes of the birds and on the accumulation of Zn in the serum. Understanding the reasons for this effect of organic Zn administered in ovo requires further detailed research.

Previous research indicates that the addition of zinc in organic form to feed for layer hens significantly increases its concentration in the egg yolk and its bioavailability, ensures high productivity during egg production, and improves egg quality [48,49]. Our results

indicate that in ovo administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (group IV) increases the concentration of Zn, which accumulates in the yolk sac and, despite its use by the embryo to build tissues, is still detected in large amounts. Zn supplementation has been shown to increase mRNA expression of CuZnSOD in the liver and its activity in broilers [50], laying hens [48], and other animal species, such as pigs [51]. The results of the present study, obtained in SDS-PAGE and western blot, confirmed the presence of Cu/Zn SOD in the liver and in the small and large intestines at 12 h and 7 days after hatching in all experimental groups and the control. Additional analysis of polyacrylamide gels using GelAnalyzer 19.1 [52] software showed the highest expression of Cu/Zn SOD in the small and large intestine at 12 h post-hatch in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (group IV) or Zn-Gly chelate (group III). At 7 days of age, however, the highest expression of Cu/Zn SOD was noted in the small intestine in group IV, receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate, and in the large intestine in group III, receiving Zn-Gly chelate. The high concentration of Cu/Zn SOD in the small intestine of chicks in the early post-hatch period is confirmed by Tang et al. [53], who showed that SOD activity is higher in the small intestine than in other tissues.

The experiment did not show differences in the expression of Cu/Zn SOD in the liver, in agreement with the analyses of the zinc concentration in this organ, which at 12 h post-hatch showed no statistical differences. This is most likely explained by the redistribution of Zn to other tissues undergoing rapid growth and development during this period.

It is interesting that despite the significant amount of Zn in the yolk sac, the western blot did not show the presence of Cu/Zn SOD.

The mass distribution profiles in the tissue homogenates differed most in the case of the small and large intestines at 12 h post-hatch and at 7 days of age for supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (groups III and IV vs. the other groups). The distributions for these groups consisted of a large number of bands corresponding to nearly the entire range of separated masses.

Screening of molecular weight distributions revealed differences depending on the sampling time and feeding group. Based on mass spectra, we determined changes in specific molecular weights, entire ranges, and soft shifts. Additionally, peak positions interpreted using the Uniprot database were used to assign specific proteins to twelve peaks. These proteins differed in their occurrence and amounts among the groups. All tissues were tested in wide ranges from 600–15,000 Da. The most significant molecular weight ranges are shown in Table 3.

Analysis of the mass spectra of proteins in the liver showed expression of MHC class I antigen, with a molecular weight of 7052 Da, in all experimental groups and the control group at 12 h post-hatch and at 7 days of age; it was highest at 7 days in group II, receiving the multi-strain probiotic in ovo. MHC class I molecules are present on most nucleated cells, and their basic function is the presentation of peptides to cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes [54]. According to Miller and Taylor [55], high expression of MHC class I in chickens is correlated with resistance to infectious diseases. The higher expression of this protein at 7 days of age in chicks is linked to the stimulation of the immune system during embryonic development, with the body's response to environmental antigens colonizing the body after hatching, and also with vaccinations against infectious diseases after hatching.

Analysis of the MALDI—TOF MS spectra of the liver tissue in all experimental groups and the control at 12 h post-hatch showed expression of the protein puromycin-sensitive aminopeptidase isozyme II (PSA-II), with a molecular weight of 2159 Da. PSA-II is a Zn²⁺ metallopeptidase present in the cytoplasm of the cells of various tissues, mainly the brain [56]. Its function involves the digestion of short polyglutamine peptides [57] and proteasome products to amino acids or peptides, which are then presented as antigens to MHC class I molecules [58]. Identification of this protein demonstrates that during the post-hatch period an immune response is activated which influences the resistance of birds in later life. The lack of expression of this protein in the liver at 7 days of age is surprising;

it may be linked to the occurrence of this isoenzyme in other tissues, such as the brain, as shown by Hui et al. [59].

At 12 h post-hatch, only the protein transthyretin (TTR), with a molecular weight of 1116 Da, was identified in the liver of birds receiving Zn-Gly chelate (group III) or Zn in combination with a multi-strain probiotic (group IV). Transthyretin, synthesized in the liver and present in the cerebrospinal fluid and plasma, is responsible for transport of thyroxine (T4) and retinol (vitamin A) [60]. Deficiency of this protein has been shown to impair the distribution of these compounds [60]. On the other hand, an unfavorable trait of transthyretin is its tendency to form amyloid fibers, which are deposited in the tissues and can lead to the development of amyloid diseases [61]. However, all biological functions of TTR in the body are not fully understood. The clear signal obtained in the study indicating synthesis of this protein in groups III and IV may be linked to supplementation with the easily absorbed organic form of Zn.

Another protein for which we observed a change in the MALDI—TOF MS analysis was FMRFamide-like neuropeptide (LPLRF-amide), with a molecular weight of 645 Da. This was present in the liver of all experimental groups and in the control, both at 12 h post-hatch and at 7 days of age. An interesting aspect of this part of the study was the shift of the peak identifying this protein at 7 days of age towards higher weights, which may be indicative of post-translational modifications of the protein during the physiological development of chickens. These neuropeptides are found in both the central and peripheral nervous system, functioning as neurotransmitters and neuromodulators [62].

Examination of the tissues of the small intestine by MALDI—TOF MS showed the presence of the characteristic protein serglycin, with a molecular weight of 14,069 Da, at 12 h post-hatch. This protein was identified in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (group IV) or Zn-Gly chelate (group III) in ovo as well as in the control group. Serglycin is a haematopoietic proteoglycan with varied functions depending on the cells in which it is synthesized [63]. The high expression of this protein in groups III and IV may be linked to the administration of easily absorbed Zn chelate, which causes activation of lymphocytes involved in the cellular response and proliferative cytokines released in the intestines [11] or may indicate inflammation developing in the intestines due to the irritant effect of excess Zn on rapidly dividing enterocytes. Expression of this protein was not observed in the chickens receiving the multi-strain probiotic (group II), which demonstrates that the strains contained in it stabilize the intestinal environment, maintaining homeostasis. Another protein identified in the small intestine at 12 h post-hatch, but only in the control group (group I), was insulin 2, with a molecular weight of 5065 Da. According to the UniProt database [64], this protein is a fragment of insulin and the product of its breakdown in the small intestine. Its expression in the control group may be due to the cells' greater need for energy substrates essential to growth and development. The lack of its expression in the experimental groups suggests that in ovo supplementation with preparations regulating glycogenesis at the cell level is effective. At 7 days of age, in the chickens receiving Zn-Gly chelate in ovo and in the control group, we also observed expression of mitochondrial inner membrane protease subunit 2, with a molecular weight of 11,296 Da. This protein is one of the mitochondrial proteases, which regulate numerous functions of the mitochondria, processes taking place in them, and their programmed death.

MALDI—TOF MS analysis of the large intestinal tissues showed expression of glutamate-cysteine ligase (gamma-ECS, gamma-glutamylcysteine synthetase), with a molecular weight of 8171 Da, at 12 h post-hatch in the experimental groups and in the control, with the highest expression shown in the chickens in group II, which received the multi-strain probiotic in ovo. This protein is the first enzyme of the biosynthesis pathway of cellular glutathione (GSH), which takes part in antioxidant processes [65]. Expression of this protein in the study groups confirms the protective role of an in ovo administered multi-strain probiotic and Zn in oxidative stress, which is important for cell survival and embryo development [66].

The protein V-type proton ATPase subunit, with a molecular weight of 9002 Da, was expressed in the tissues of the large intestine of the control group at 12 h post-hatch. We also showed expression of this protein at 12 h post-hatch in the yolk sac in all groups, with the highest expression shown in the yolk sac of the birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate in ovo (group IV). This protein performs numerous functions, including in pH regulation, leads to acidification of intracellular compartments, is responsible for proton transport from the cytosol to the extracellular space, and also takes part in neoplastic and neurodegenerative processes [67,68]. An important function of this protein is its involvement in maintaining the homeostasis of nutrients and energy in cells [69].

Differences in the peptide and protein composition of the test samples were least evident in the case of the yolk sacs. Differences were shown in the intensity of peaks with molecular weights of 9152 Da, corresponding to epidermal differentiation protein (NK2 homeobox 3); 9678 Da, corresponding to prolactin-releasing hormone; and 8433 Da, corresponding to protein-serine/threonine phosphatase. The concentrations of these peptides were shown to increase significantly following in ovo supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (group IV) or Zn-Gly chelate (group III). Literature data indicate that these proteins perform numerous functions in the body, including involvement in cell differentiation, the cell cycle, regulation of the immune response, metabolic processes, growth, development, and reproduction [70,71].

5. Conclusions

In summary, we have demonstrated that in ovo supplementation of Zn-Gly chelate alone and in combination with a multi-strain probiotic has a significant impact on Zn metabolism in the embryo and newly hatched chicks, which is reflected in increased concentration of Zn in the serum and yolk sac. It is believed that the accumulation of zinc in the yolk sac and gastrointestinal tract is associated with a protective function for the embryo and chicks through the element's participation in antioxidant defense processes. Both dietary supplements also contributed to an increase in zinc concentration in the liver in birds aged 7 days. Additionally, analysis of the MALDI—TOF MS spectra of the tissues of chickens showed in all experimental groups expression of different proteins and peptides presumably performing numerous and diverse functions in the chicks during the post-hatching period, including regulation of the immune response, metabolic processes, growth, development, and reproduction. It is worth noting that differences in protein expression depended on the type of diet supplement, the type of tissues analyzed, and when the analyses were performed. However, understanding of the mechanisms underlying these differences will require further research with the use of imaging of the proteome of individual tissues and identification of differentiating proteins by MALDI—TOF MS.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cimb46020080/s1>, Table S1: Results of two-way ANOVA for the effect of zinc-glycine chelate (group III, Zn-Gly+) and multi-strain probiotic (group II, Prob+) and interaction of Zn-Gly+Prob+ (group IV) supplementation on zinc level in selected tissues at 12 h and 7 days after hatching. Figure S1: SDS-PAGE protein gels stained with Coomassie brilliant blue. The gels contain proteins from chicken large intestine. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S2: SDS-PAGE protein gels stained with silver. The gels contain proteins from chicken large intestine. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S3: SDS-PAGE protein gels stained with Coomassie brilliant blue. The gels contain proteins from chicken small intestine. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain

probiotic and zinc glycine chelate. Figure S4: SDS-PAGE protein gels stained with silver. The gels contain proteins from chicken small intestine. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S5: SDS-PAGE protein gels stained with Coomassie brilliant blue. The gels contain proteins from chicken yolk sac. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S6: SDS-PAGE protein gels stained with silver. The gels contain proteins from chicken yolk sac. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S7: Western blot with SOD band extracted from chicken large intestine. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S8: Western blot with SOD band extracted from chicken liver. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. Figure S9: Western blot with SOD band extracted from chicken yolk sac. I—control group (Zn-Gly-Prob-; eggs injected with 0.9% physiological saline solution); group II (Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic; group III (Zn-Gly+)—eggs injected with zinc glycine chelate; group IV (Zn-Gly+Prob+)—eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate.

Author Contributions: Conceptualization, A.C. and Ł.S.J.; methodology, A.C., Ł.S.J. and K.M.; software, A.R.; validation, A.C. and K.M.; formal analysis, A.C. and Ł.S.J.; investigation, A.C., Ł.S.J. and J.W.; resources, K.M. and A.R.; data curation, B.S.; writing—original draft preparation, A.C. and Ł.S.J.; writing—review and editing, A.C., Ł.S.J. and A.M.; visualization, A.R.; supervision, Z.G.; project administration, Ł.S.J. and Z.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Life Sciences in Lublin, Poland, project No. SD/77/WET/2023.

Institutional Review Board Statement: All procedures involving animals were in compliance with the ethical standards of the institution at which the experiment was conducted. All procedures used during the research were approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval no. 106/2022 of 17 October 2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article, and are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria, educational grants, participation in speakers' bureaus, membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest, expert testimony, or patent-licensing arrangements) or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge, or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

1. Olejnik, K.; Popiela, E.; Opaliński, S. Emerging precision management methods in poultry sector. *Agriculture* **2022**, *12*, 718. [\[CrossRef\]](#)
2. Grzinić, G.; Piotrowicz-Cieślak, A.; Klimkowicz-Pawlas, A.; Górny, R.L.; Ławniczek-Wałczyk, A.; Piechowicz, L.; Olkowska, E.; Potrykus, M.; Tankiewicz, M.; Krupka, M.; et al. Intensive poultry farming: A review of the impact on the environment and human health. *Sci. Total Environ.* **2023**, *858*, 160014. [\[CrossRef\]](#)
3. Mesquita, M.A.; Araújo, I.C.S.; Café, M.B.; Arnhold, E.; Mascarenhas, A.G.; Carvalho, F.B.; Stringhini, J.H.; Leandro, N.S.M.; Gonzales, E. Results of hatching and rearing broiler chickens in different incubation systems. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 94–102. [\[CrossRef\]](#)

4. Yalcin, S.; Özkan, S.; Shah, T. Incubation temperature and lighting: Effect on embryonic development, post-hatch growth, and adaptive response. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 899977. [\[CrossRef\]](#)
5. Adedokun, S.A.; Olojede, O.C. Optimizing gastrointestinal integrity in poultry: The role of nutrients and feed additives. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *5*, 348. [\[CrossRef\]](#)
6. Jha, R.; Singh, A.K.; Yadav, S.; Berrocoso, J.F.D.; Mishra, B. Early nutrition programming (in ovo and post-hatch feeding) as a strategy to modulate gut health of poultry. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 82. [\[CrossRef\]](#)
7. Peebles, E.D. In ovo applications in poultry: A review. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 2322–2338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Oliveira, T.F.B.; Bertechini, A.G.; Bricka, R.M.; Kim, E.J.; Gerard, P.D.; Peebles, E.D. Effects of in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 2488–2494. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Jha, R.; Das, R.; Oak, S.; Mishra, P. Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. *Animals* **2020**, *10*, 1863. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Oladokun, S.; Adewole, D.I. In ovo delivery of bioactive substances: An alternative to the use of antibiotic growth promoters in poultry production—A review. *J. Appl. Poult. Res.* **2020**, *29*, 744–763. [\[CrossRef\]](#)
11. Ciszewski, A.; Jarosz, Ł.; Marek, A.; Michalak, K.; Grądzki, Z.; Kaczmarek, B.; Rysiak, A. Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, 102823. [\[CrossRef\]](#)
12. Ezzulddin, T.A.; Jwher, D.M. Beneficial microorganisms in animal production and environment. *J. Appl. Vet. Sci.* **2022**, *7*, 64–71. [\[CrossRef\]](#)
13. Jwher, D.M.T.; Abd, S.K.; Mohammad, A.G. The study of using effective microorganisms (EM) on health and performance of broiler chicks. *Iraqi J. Vet. Sci.* **2013**, *27*, 73–78. [\[CrossRef\]](#)
14. Esatu, W.; Melesse, A.; Dessie, T. Effect of effective microorganisms on growth parameters and serum cholesterol levels in broilers. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6*, 3841–3846. [\[CrossRef\]](#)
15. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Slawinska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (EM) on performance, intestinal morphology and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2020**, *104*, 1444–1453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Bäckhed, F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann. Nutr. Metab.* **2011**, *58*, 44–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Huang, Y.L.; Lu, L.; Li, S.F.; Luo, X.G.; Liu, B. Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 2038–2046. [\[CrossRef\]](#)
18. Salim, H.M.; Lee, H.R.; Jo, C.; Lee, S.K.; Lee, B.D. Effect of sources and levels of zinc on the tissue mineral concentration and carcass quality of broilers. *Avian Biol. Res.* **2010**, *3*, 23–29. [\[CrossRef\]](#)
19. Jarosz, Ł.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Kwiecień, M.; Kalinowski, M. The effect of feed supplementation with zinc chelate and zinc sulphate on selected humoral and cell-mediated immune parameters and cytokine concentration in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *112*, 59–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Jarosz, Ł.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Laskowska, E.; Kwiecień, M. Effect of zinc sulfate and zinc glycine chelate on concentrations of acute phase proteins in chicken serum and liver tissue. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *187*, 258–272. [\[CrossRef\]](#)
21. Jarosz, Ł.; Marek, A.; Grądzki, Z.; Kwiecień, M.; Żylinska, B.; Kaczmarek, B. Effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulfate on cytokine and immunoglobulin gene expression profiles in chicken intestinal tissue. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 4224–4235. [\[CrossRef\]](#)
22. Olechnowicz, J.; Tinkov, A.; Skalny, A.; Suliburska, J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J. Physiol. Sci.* **2018**, *68*, 19–31. [\[CrossRef\]](#)
23. Adisa, A.O.; Odutuga, A.A. Metabolic interactions between zinc and essential fatty acids in the mammalian organism. *Nutr. Food Sci.* **1999**, *99*, 99–104. [\[CrossRef\]](#)
24. Winiarska-Mieczan, A.; Jachimowicz, K.; Kwiecień, M.; Kislova, S.; Baranowska-Wójcik, E.; Zasadna, Z.; Yanovych, D.; Kowalczyk-Vasilev, E. The impact of Zn, Cu and Fe chelates on the fatty-acid profile and dietary value of broiler-chicken thigh meat. *Animals* **2021**, *11*, 3115. [\[CrossRef\]](#)
25. Kim, H.J.; Kang, H.K. Effects of in ovo injection of zinc or diet supplementation of zinc on performance, serum biochemical profiles, and meat quality in broilers. *Animals* **2022**, *12*, 630. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Zhang, Y.; Xie, L.; Ding, X.; Wang, Y.; Xu, Y.; Li, D.; Liang, S.; Wang, Y.; Zhang, L.; Fu, A.; et al. Mechanisms underlying the protective effect of maternal zinc (ZnSO₄ or Zn-Gly) against heat stress-induced oxidative stress in chicken embryo. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1699. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Hatab, M.H.; Rashad, E.; Saleh, H.M.; El-Sayed, E.R.; Taleb, A.M.A. Effects of dietary supplementation of myco-fabricated zinc oxide nanoparticles on performance, histological changes, and tissues Zn concentration in broiler chicks. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 18791. [\[CrossRef\]](#)
28. Rubio, L.A. Possibilities of early life programming in broiler chickens via intestinal microbiota modulation. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 695–706. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Pan, D.; Yu, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 108–119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Varvara, R.A.; Vodnar, D.C. Probiotic-driven advancement: Exploring the intricacies of mineral absorption in the human body. *Food Chem. X* **2023**, *21*, 101067. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Bielik, V.; Kolisek, M. Bioaccessibility and bioavailability of minerals in relation to a healthy gut microbiome. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6803. [\[CrossRef\]](#)

32. Malyar, R.M.; Li, H.; Liu, D.; Abdulrahim, Y.; Farid, R.A.; Gan, F.; Ali, W.; Enayatullah, H.; Banuree, S.A.H.; Huang, K.; et al. Selenium/Zinc-enriched probiotics improve serum enzyme activity, antioxidant ability, inflammatory factors and related gene expression of Wistar rats inflated under heat stress. *Life Sci.* **2020**, *248*, 117464. [CrossRef]
33. De Palmieri, L.C.; Lima, L.M.; Freire, J.B.; Bleicher, L.; Polikarpov, I.; Almeida, F.C.; Foguel, D. Novel Zn²⁺-binding sites in human transthyretin: Implications for amyloidogenesis and retinol-binding protein recognition. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31731–31741. [CrossRef]
34. Martinez, M.M.; Hill, G.M.; Link, J.E.; Raney, N.E.; Tempelman, R.J.; Ernst, C.W. Pharmacological zinc and phytase supplementation enhance metallothionein mRNA abundance and protein concentration in newly weaned pigs. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 538–544. [CrossRef] [PubMed]
35. Bondzio, A.; Pieper, R.; Gabler, C.; Weise, C.; Schulze, P.; Zentek, J.; Einspanier, R. Feeding low or pharmacological concentrations of zinc oxide changes the hepatic proteome profiles in weaned piglets. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81202. [CrossRef] [PubMed]
36. Martínez-Montemayor, M.M.; Hill, G.M.; Raney, N.E.; Rilmington, V.D.; Tempelman, R.J.; Link, J.E.; Wilkinson, C.P.; Ramos, A.M.; Ernst, C.W. Gene expression profiling in hepatic tissue of newly weaned pigs fed pharmacological zinc and phytase supplemented diets. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 421. [CrossRef] [PubMed]
37. Alizadeh, M.; Bavananthasivam, J.; Shojadoost, B.; Astill, J.; Taha-Abdelaziz, K.; Alqazlan, N.; Boodhoo, N.; Doost, J.S.; Sharif, S. In ovo and oral administration of probiotic *Lactobacilli* modulate cell- and antibody mediated immune responses in newly hatched chicks. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 664387. [CrossRef] [PubMed]
38. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Available online: <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals> (accessed on 24 February 2020).
39. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [CrossRef] [PubMed]
40. Radi, A.M.; Abdel Azeem, N.M.; EL-Nahass, E.S. Comparative effects of zinc oxide and zinc oxide nanoparticle as feed additives on growth, feed choice test, tissue residues, and histopathological changes in broiler chickens. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 5158–5167. [CrossRef] [PubMed]
41. Ramiah, S.K.; Awad, E.A.; Mookiah, S.; Idrus, Z. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth performance and concentrations of malondialdehyde, zinc in tissues, and corticosterone in broiler chickens under heat stress conditions. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 3828–3838. [CrossRef]
42. Mohan, J.; Ali, S.A.; Suvartan, R.; Kapila, S.; Sharma, R.; Tomar, S.K.; Behare, P.; Yadav, H. Bioavailability of biotransformed zinc enriched dahi in wistar rats. *Int. J. Probiotics Prebiotics* **2018**, *13*, 45–54. [PubMed]
43. Mrvcic, J.; Prebeg, T.; Barisic, L.; Stanzer, D.; Bacun-Druzina, V.; Stehlik-Tomas, V. Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* **2009**, *47*, 381–388.
44. Świątkiewicz, S.; Koreleski, J.; Zhong, D.Q. The bioavailability of zinc from inorganic and organic sources in broiler chickens as affected by addition of phytase. *J. Anim. Feed Sci.* **2001**, *10*, 317–328. [CrossRef]
45. Yi, Z.; Kornegay, E.T.; Denbow, D.M. Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poult. Sci.* **1996**, *75*, 540–546. [CrossRef] [PubMed]
46. Thiel, U.; Weigand, E. Influence of dietary zinc and microbial phytase supplementation on zinc retention and zinc excretion in broiler chicks. In Proceedings of the XIX World's Poultry Congress, Amsterdam, The Netherlands, 20–24 September 1992.
47. Augspurger, N.R.; Spencer, J.D.; Webel, D.M.; Baker, D.H. Pharmacological zinc levels reduce the phosphorus-releasing efficacy of phytase in young pigs and chickens. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 1732–1739. [CrossRef] [PubMed]
48. Li, L.L.; Gong, Y.J.; Zhan, H.Q.; Zheng, Y.X.; Zou, X.T. Effects of dietary Zn-methionine supplementation on the laying performance, egg quality, antioxidant capacity, and serum parameters of laying hens. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 923–931. [CrossRef] [PubMed]
49. Sun, X.; Lu, L.; Liao, X.; Zhang, L.; Lin, X.; Luo, X.; Ma, Q. Effect of in ovo zinc injection on the embryonic development and epigenetics-related indices of zinc-deprived broiler breeder eggs. *Biol. Trace. Elem. Res.* **2018**, *185*, 456–464. [CrossRef] [PubMed]
50. Liu, Z.H.; Lu, L.; Wang, R.L.; Lei, H.L.; Li, S.F.; Zhang, L.Y.; Luo, X.G. Effects of supplemental zinc source and level on antioxidant ability and fat metabolism-related enzymes of broilers. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 2686–2694. [CrossRef]
51. Wang, M.Q.; Tao, W.J.; Ye, S.S.; Du, Y.J.; Wang, C.; Shen, S.X. Effects of dietary pharmacological zinc on growth, liver metallothionein, Cu, Zn-SOD concentration and serum parameters in piglets. *J. Anim. Vet. Adv.* **2012**, *11*, 1390–1394. [CrossRef]
52. Lazar, I., Jr.; Lazar, I., Sr. Gel Analyzer 19.1. Available online: www.gelanalyzer.com (accessed on 1 December 2022).
53. Tang, D.; Wu, J.; Jiao, H.; Wang, X.; Zhao, J.; Lin, H. The development of antioxidant system in the intestinal tract of broiler chickens. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 664–678. [CrossRef]
54. Silva, A.P.D.; Gallardo, R.A. The Chicken MHC: Insights into genetic resistance, immunity, and inflammation following infectious bronchitis virus infections. *Vaccines* **2020**, *8*, 637. [CrossRef]
55. Miller, M.M.; Taylor, R.L., Jr. Brief review of the chicken Major Histocompatibility Complex: The genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance. *Poult. Sci.* **2016**, *95*, 375–392. [CrossRef]
56. Karsten, S.L.; Sang, T.K.; Gehman, L.T.; Chatterjee, S.; Liu, J.; Lawless, G.M.; Sengupta, S.; Berry, R.W.; Pomakian, J.; Oh, H.S.; et al. A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron* **2006**, *51*, 549–560. [CrossRef]
57. Bhutani, N.; Venkatraman, P.; Goldberg, A.L. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1385–1396. [CrossRef] [PubMed]

58. Stoltze, L.; Schirle, M.; Schwarz, G.; Schröter, C.; Thompson, M.W.; Hersh, L.B.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.G.; Schild, H. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* **2000**, *1*, 413–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Hui, K.S.; Saito, M.; Hui, M.; Saito, M.; Lajtha, A.; Yamamoto, K.; Osawa, T. Two cytosolic puromycin-sensitive aminopeptidase isozymes in chicken brain: Molecular homology to brain-specific 14-3-3 protein. *Neurochem. Int.* **1993**, *22*, 445–453. [[CrossRef](#)]
60. Li, X.; Buxbaum, J.N. Transthyretin and the brain re-visited: Is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer's disease? *Mol. Neurodegener.* **2011**, *6*, 79. [[CrossRef](#)]
61. Rapezzi, C.; Quarta, C.C.; Riva, L.; Longhi, S.; Gallelli, I.; Lorenzini, M.; Ciliberti, P.; Biagini, E.; Salvi, F.; Branzi, A. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: A clinical overview. *Nat. Rev. Cardiol.* **2010**, *7*, 398–408. [[CrossRef](#)]
62. Dockray, G.J.; Sault, C.; Holmes, S. Antibodies to FMRF amide, and the related pentapeptide LPLRF amide, reveal two groups of immunoreactive peptides in chicken brain. *Regul. Pept.* **1986**, *16*, 27–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Schick, B.P.; Gradowski, J.F.; San Antonio, J.D. Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells. *Blood* **2001**, *97*, 449–458. [[CrossRef](#)]
64. The UniProt Consortium. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D523–D531. [[CrossRef](#)]
65. Franklin, C.C.; Backos, D.S.; Mohar, I.; White, C.C.; Forman, H.J.; Kavanagh, T.J. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects. Med.* **2009**, *30*, 86–98. [[CrossRef](#)]
66. Dalton, T.P.; Chen, Y.; Schneider, S.N.; Nebert, D.W.; Shertzer, H.G. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 1511–1526. [[CrossRef](#)]
67. Forgac, M. Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *8*, 917–929. [[CrossRef](#)]
68. Casey, J.R.; Grinstein, S.; Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *11*, 50–61. [[CrossRef](#)]
69. Xu, H.; Ren, D. Lysosomal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **2015**, *77*, 57–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Mo, G.; Hu, B.; Wei, P.; Luo, Q.; Zhang, X. The role of chicken prolactin, growth hormone and their receptors in the immune system. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 900041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Bastan, R.; Eskandari, N.; Sabzghabae, A.M.; Manian, M. Serine/threonine phosphatases: Classification, roles and pharmacological regulation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2014**, *27*, 473–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Table S1. Results of two-way ANOVA for the effect of zinc-glycine chelate (group III, Zn-Gly+) and multi-strain probiotic (group II, Prob+) and interaction Zn-Gly+Prob+ (group IV) supplementation on zinc level in selected tissues at 12 hours and 7 days after hatching.

Effect/Interaction	Serum									
	12 h					7 days				
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
Corrected model	8.68	1	8.68	894.59	>0.01	0.56	1	0.56	92.59	>0.01
Zn-Gly+ (group III)	13.35	1	13.35	1375.24	>0.01	0.00	1	0.00	0.25	0.62
Prob+ (group II)	0.03	1	0.03	2.75	0.11	0.16	1	0.16	25.74	>0.05
Zn-Gly+Prob+ (group IV)	8.64	1	8.64	889.93	>0.01	0.01	1	0.01	1.23	0.28
Error	0.19	20	0.01	0.00		0.12	20	0.01	0.00	
	Liver									
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
Corrected model	3886.47	1	3886.47	1969.23	>0.01	210.56	1	210.56	901423484.00	>0.01
Zn-Gly+ (group III)	3.51	1	3.51	1.78	0.19	0.00	1	0.00	131.00	>0.01
Prob+ (group II)	18.73	1	18.73	9.49	>0.05	0.00	1	0.00	0.00	0.77
Zn-Gly+Prob+ (group IV)	2.04	1	2.04	1.03	0.32	0.00	1	0.00	3.00	0.12
Error	39.47	20	1.97	0.00		0.00	20	0.00	0.00	
	Small intestine									
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
Corrected model	543.17	1	543.17	11675.75	>0.01	2.487035E+41	1	2.487035E+41	126.48	>0.01
Zn-Gly+ (group III)	0.01	1	0.01	0.29	0.60	1.152930E+41	1	1.152930E+41	58.63	>0.01
Prob+ (group II)	0.00	1	0.00	0.10	0.76	1.651029E+40	1	1.651029E+40	8.40	>0.05
Zn-Gly+Prob+ (group IV)	0.01	1	0.01	0.28	0.60	1.597927E+40	1	1.597927E+40	8.13	>0.05
Error	0.93	20	0.05	0.00		3.932776E+40	20	1.966388E+39		
	Yolk sac									
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
	SS	df	MS	F	p	SS	df	MS	F	p
Corrected model	426.10	1	426.10	9803.90	>0.01					
Zn-Gly+ (group III)	4.10	1	4.10	94.43	>0.01					
Prob+ (group II)	0.02	1	0.02	0.50	0.5					
Zn-Gly+Prob+	1.81	1	1.81	41.56	>0.01					

(group IV)			
Error	0.87	20	0.04

SS – sum of squares; df – degrees of freedom; MS – mean square; F – ratio of variance, *p* – significance level.

Figura S1.

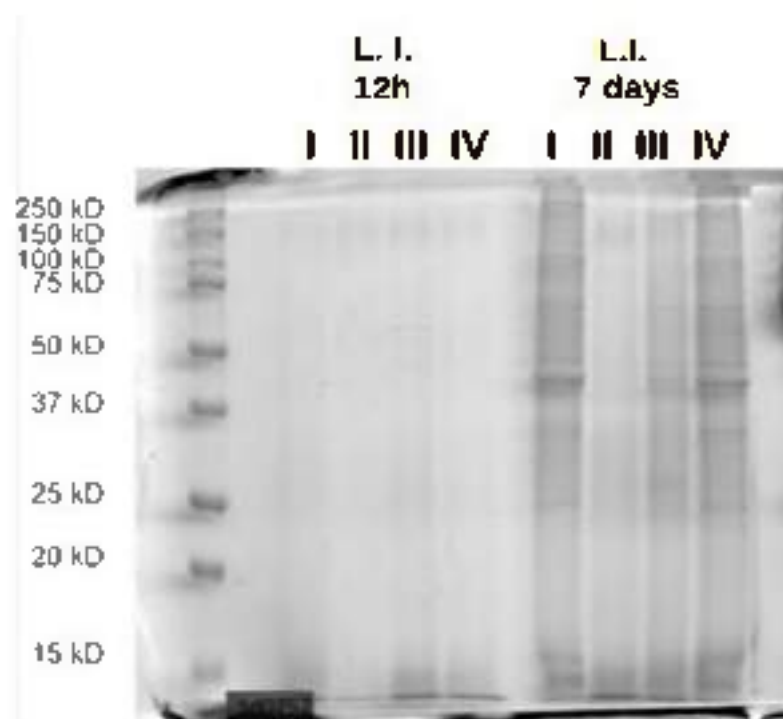


Figura S2.

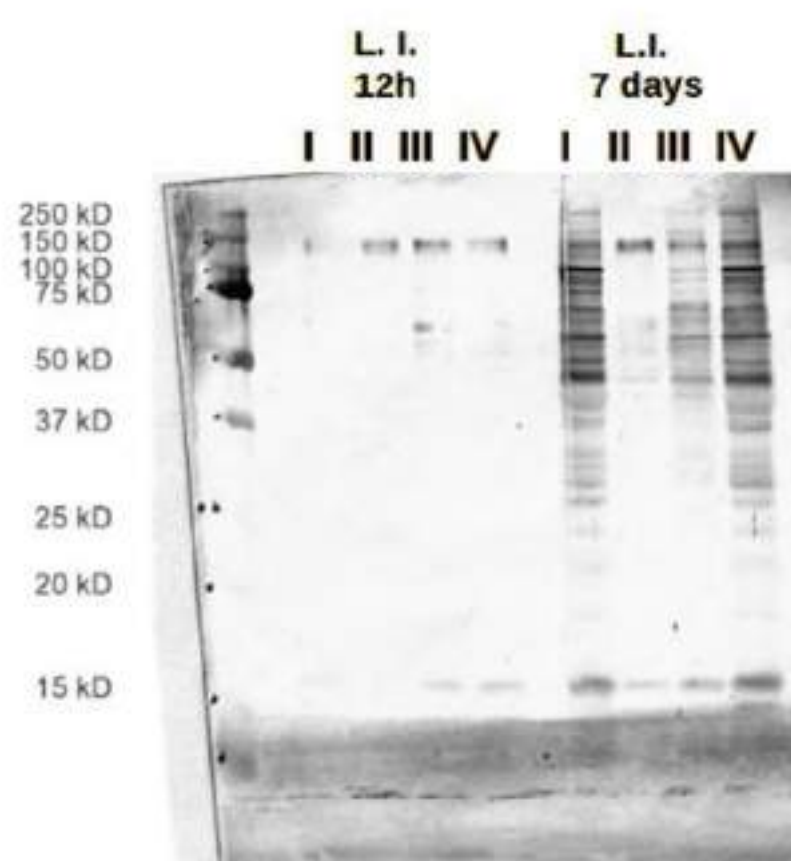


Figura S3.

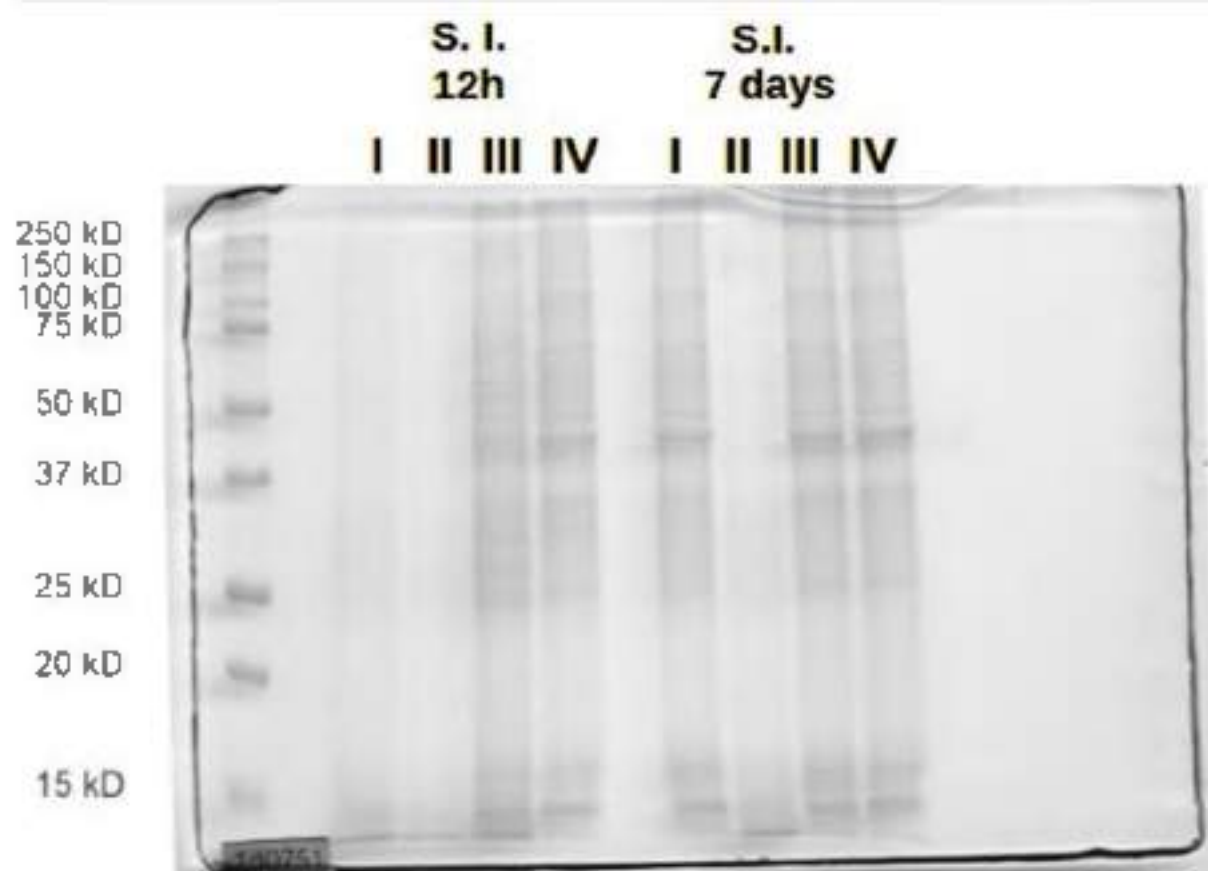


Figura S4.

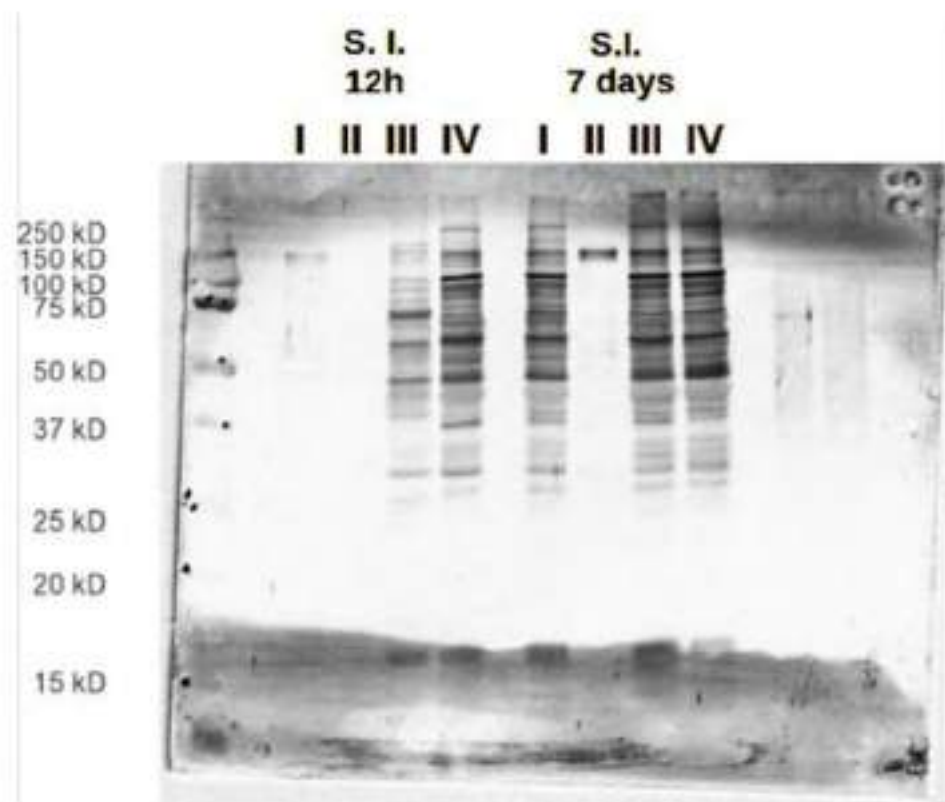


Figura S5.

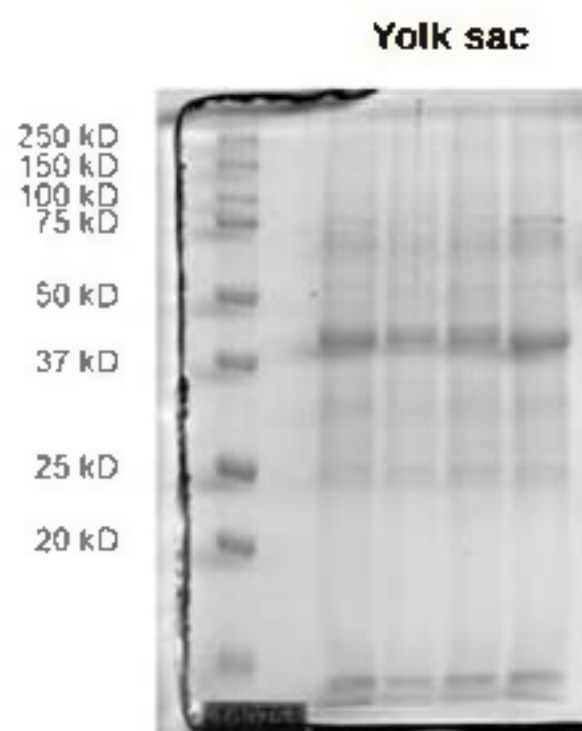


Figura S6.

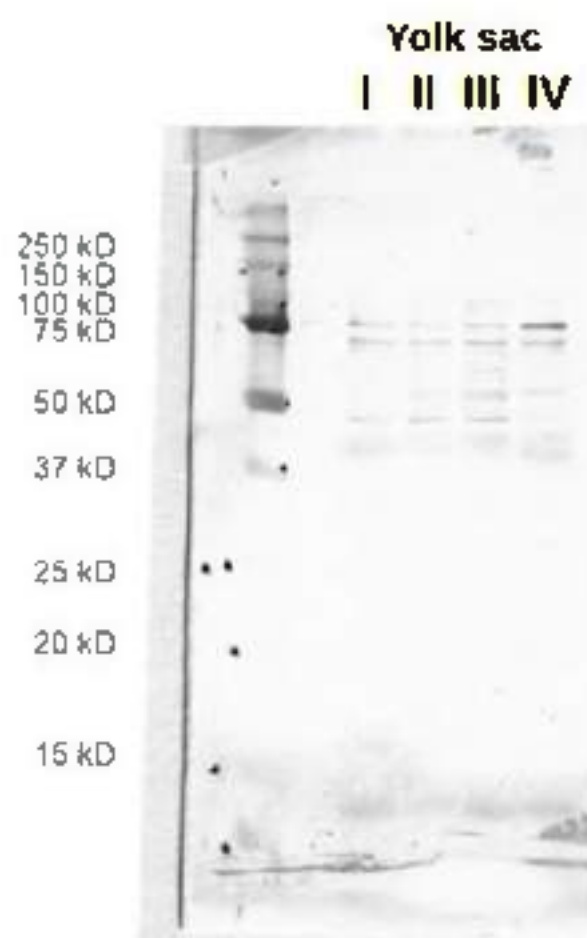


Figura S7.

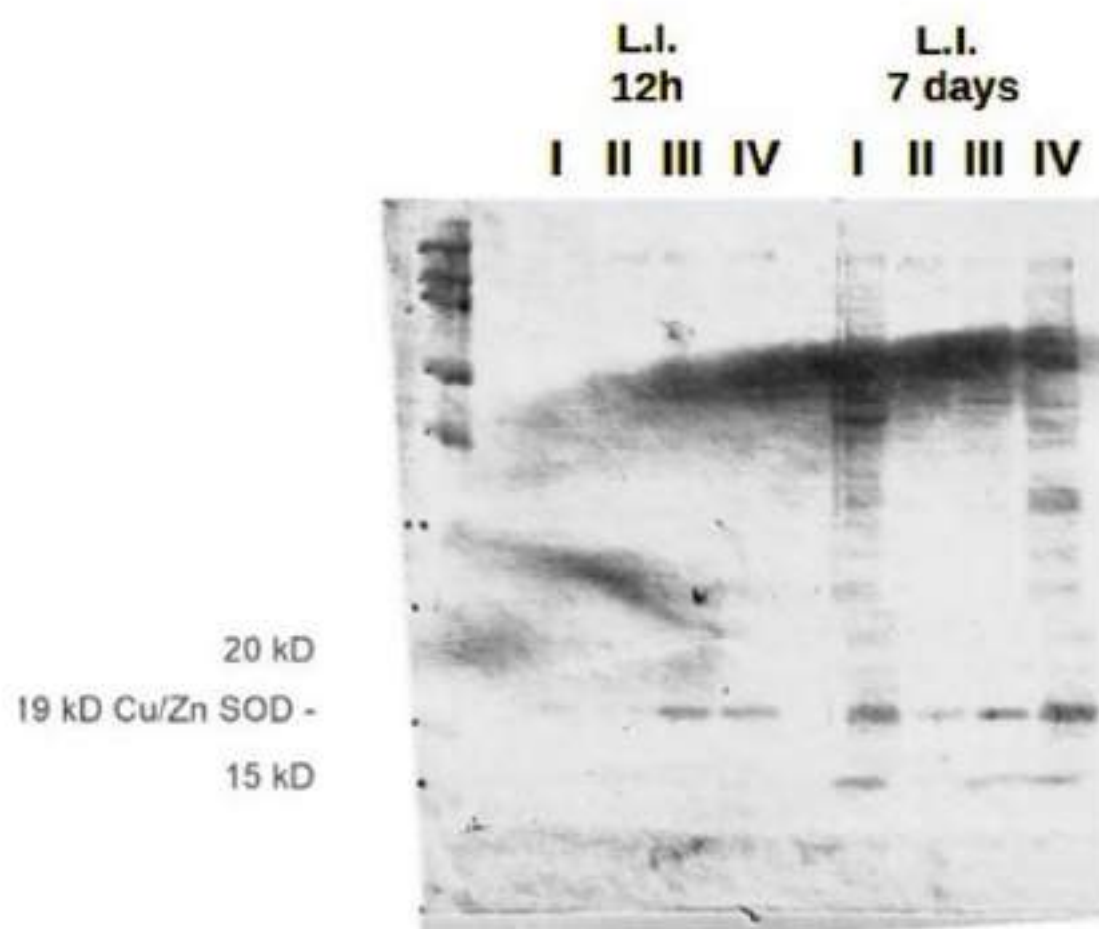


Figura S8.

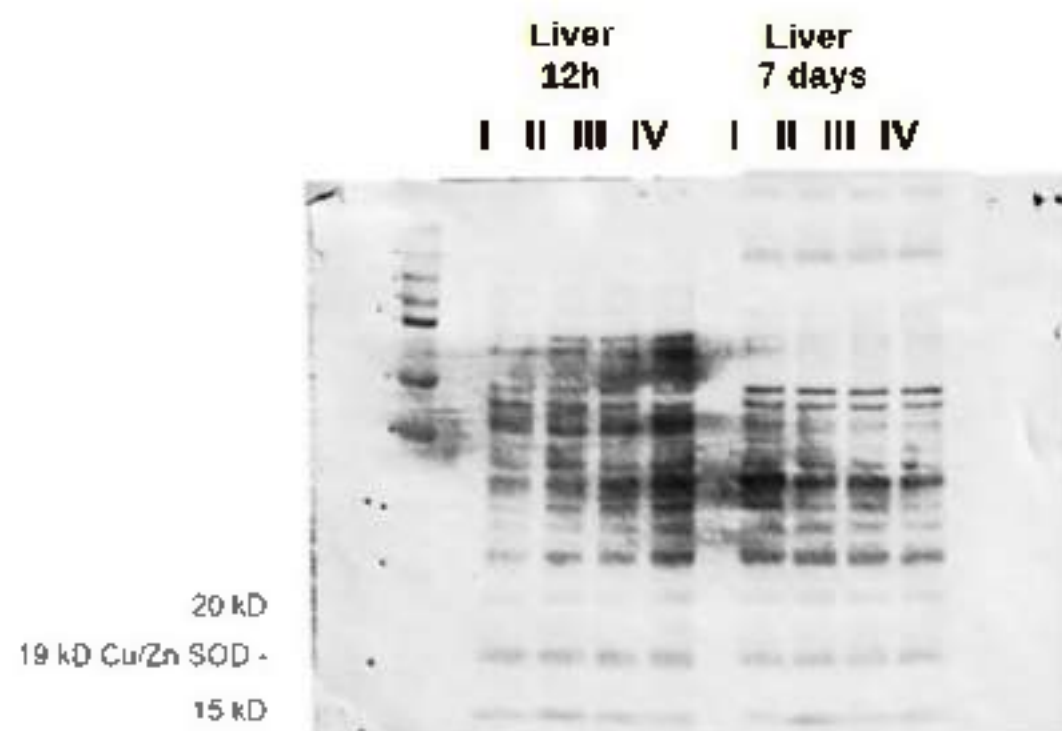
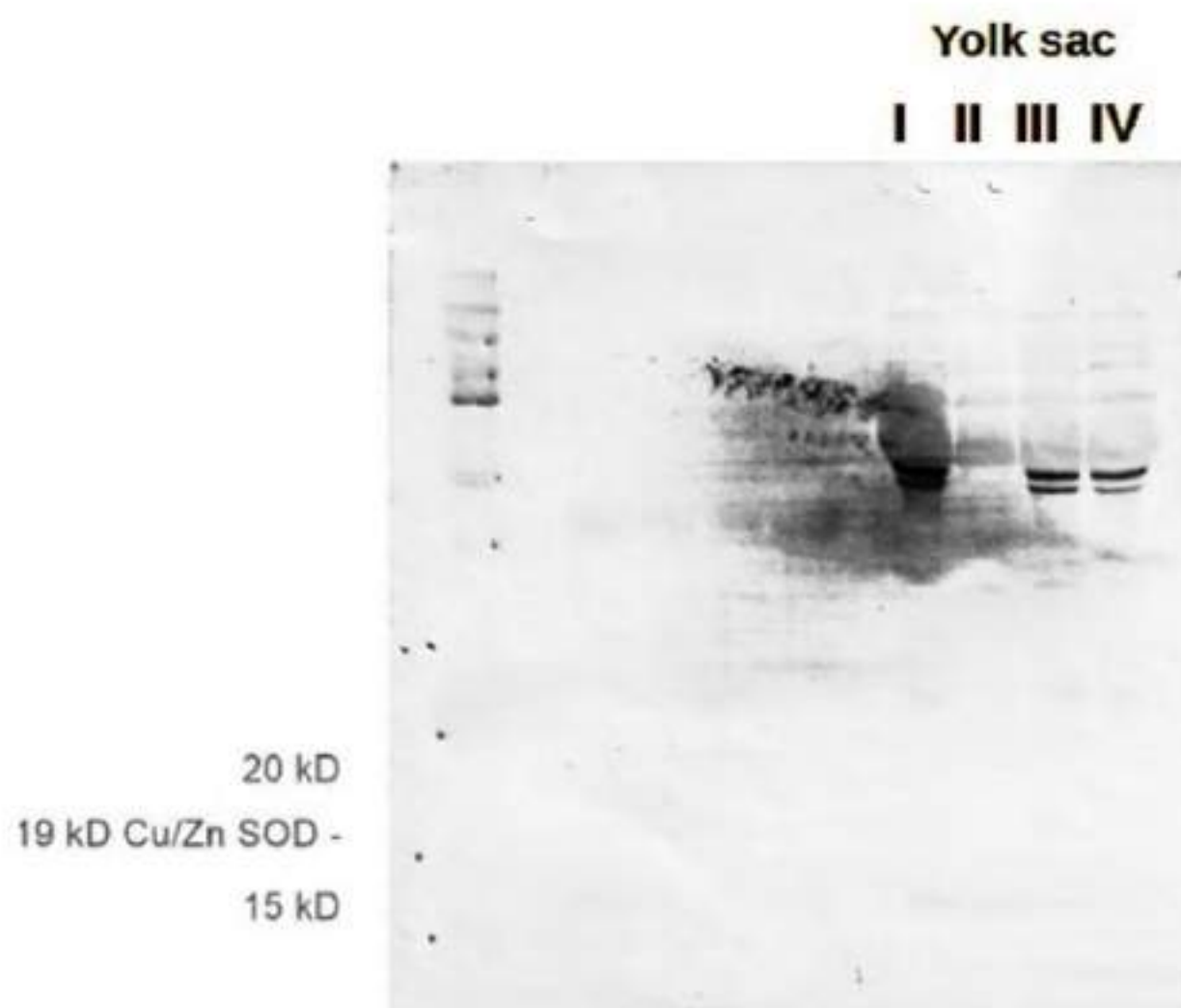


Figura S9.





Effect of *in ovo* feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens

Artur Ciszewski^a, Łukasz S. Jarosz^{a,*}, Zbigniew Grądzki^a, Agnieszka Marek^b, Sebastian Kaczmarek^c, Małgorzata Kwiecień^d, Anna Rysiak^e

^a Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

^b Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

^c Department of Animal Nutrition and Feed Management, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

^d Faculty of Biology and Animal Breeding, Institute of Animal Nutrition and Bromatology, Department of Animal Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

^e Department of Botany, Mycology, and Ecology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

HIGHLIGHTS

- Supplementation of chicken embryos affects the quality of poultry meat.
- Probiotic and Zn-Gly chelate stimulates the synthesis of saturated fatty acids.
- Probiotic and Zn-Gly chelate supplemented *in ovo* reduce the concentration of MUFA.
- Probiotic and Zn-Gly chelate supplemented *in ovo* reduce the oxidative stress.
- Probiotic and Zn-Gly chelate reduce the PUFA concentration in muscles.

ARTICLE INFO

Keywords:

Chicken
In ovo, zinc glycine chelate
Multi-strain probiotic
Fatty acid
Malondialdehyde

ABSTRACT

Modern poultry production strives to ensure the safety of food products by constantly improving the health parameters of birds. Multi-strain probiotics containing effective microorganisms and microelements, especially zinc in chelated form, currently play an important role in poultry feeding. We hypothesized that supplementation of chicken embryos with a multi-strain probiotic and glycine-zinc chelate may influence lipid metabolism in the serum and tissues of newly hatched chicks, leading to an increase in the body's antioxidant capacity. Therefore, the aim of the study was to assess the lipid profile, fatty acid profile and malondialdehyde (MDA) concentration in the serum and tissues of newly hatched chickens supplemented *in ovo* with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. The experiment was conducted on 1,500 fertilized hatching eggs obtained from 36-week-old commercial broilers (Ross x Ross 308). A multi-strain probiotic and zinc glycine chelate (Zn-Gly) were administered on the 17th day of incubation. Samples of peripheral blood and tissues of the liver, small intestine (ileum), pectoral muscle, thigh muscle and yolk sac, collected on the day of hatch and at 7 days post-hatch, were used to analyse biochemical parameters and determine the malondialdehyde level and fatty acid profile. The results indicate that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate on the 17th day of incubation affects fat metabolism. Simultaneous administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate did not increase the concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the muscles. In birds treated with Zn-Gly chelate, the PUFA concentration was increased in the muscle tissue in the period up to 7 days post-hatch, i.e. during the development of the chicks. Moreover, the analysis of the results confirmed that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate stimulates the synthesis of saturated fatty acids (SFAs), mainly stearic, palmitic and myristic acids, and improves the ratio of PUFAs to SFAs. The multi-strain probiotic

* Corresponding author.

E-mail address: lukasz.jarosz@up.lublin.pl (Ł.S. Jarosz).

<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>

Received 17 June 2024; Received in revised form 8 September 2024; Accepted 19 September 2024

Available online 24 September 2024

1871-1413/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

and Zn-Gly chelate administered *in ovo* did not cause excessive MDA synthesis in the tissues, suggesting that these preparations reduce oxidative stress in the developing embryo and newly hatched chick.

1. Introduction

Modern poultry production, based on the principles of sustainable development, strives to obtain the largest possible amount of chicken meat while guaranteeing the safety of food products by continually raising the health parameters of birds (Hafez and Attia, 2020). Positive production results and good health status in chickens can be ensured by producing chicks with beneficial genetic traits and maintaining a high immune status by means of a suitable diet during their growth and development. One means of achieving these goals is to use *in ovo* feeding technology during chicken embryogenesis, whereby nutrients and other biogenic compounds, e.g. amino acids, carbohydrates, vitamins, hormones, growth factors, micro- and macroelements, and also pre-, pro- and synbiotics, are administered to the embryo at various time periods (Cheled-Shoval et al., 2011; Bhanja et al., 2015; Zhao et al., 2017; Muyyarikkandy et al., 2023).

Multi-strain probiotics containing effective microorganisms and microelements, especially zinc in chelated form, currently play an important role in poultry feeding. Park et al. (2016) showed that probiotics are involved in lipid metabolism and can change the fatty acid (FA) composition of tissues. An important advantage of probiotics, especially those based on strains of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*, is their hypocholesterolaemic effect, which helps to reduce cholesterol levels in animals and humans (Anderson and Gilliland, 1999). In addition to probiotics, microelements such as zinc also influence the metabolism of fatty acids (FA) (Cunnane, 1988). Zn has been shown to reduce the activity of desaturases, thereby inhibiting conversion of polyunsaturated fatty acids to arachidonic acid and reducing synthesis of eicosanoids (Stawarska et al., 2021). Supplementation with zinc also reduces levels of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in poultry. It is also worth noting that the use of easily absorbed Zn-Met chelate in the diet of layer hens reduces serum concentrations of triglycerides and LDL cholesterol, while increasing the total cholesterol level (Fawzy et al., 2016; Abd El-Hack et al., 2018).

The chicken embryo is particularly susceptible to lipid peroxidation, especially in the final stage of development (Speake et al., 1998a, 1998b). The metabolism rate and oxygen use by the embryo increase in the final days of incubation and during hatching, which is conducive to the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS accelerate oxidation of lipids contained in the yolk, which leads to cell membrane damage and ultimately to the death of the developing chicken embryo (Surai et al., 1999a, 1999b; Hohtola, 2002; Surai, et al., 2016). In this context, increasing the ability of the embryo to defend itself against the harmful effects of oxidative stress should be regarded as one means of preventing embryonic death. Previously published research results have shown that probiotic bacteria and Zn used in the diet of poultry influence the content and activity of antioxidant enzymes, in part by increasing T-AOC and SOD levels and reducing MDA levels, which limits damage caused by oxidative stress (Sahin and Kucuk, 2003; Sahin et al., 2005, 2009; Kucuk 2008; Attia et al., 2017; Zhang et al., 2021).

The available literature contains no information on the effect of the combined use of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and zinc glycine chelate on lipid metabolism in poultry. In our study, we tested the hypothesis that co-supplementation with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and zinc glycine chelate at 17 days (E17) of embryonic development affects lipid metabolism by increasing synthesis of PUFAs and triglycerides and reducing synthesis of LDL and MDA in the serum and tissues of newly hatched chicks, leading to inhibition of lipid peroxidation processes and increasing the antioxidant capacity of the organism. Therefore, the aim of this study was to evaluate the lipid profile, fatty acid profile, and MDA

concentration in the serum and tissues of newly-hatched chickens fed *in ovo* with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate. The results will provide a better understanding of the role of multi-strain probiotics containing effective microorganisms and zinc glycine chelate in lipid metabolism and antioxidant processes in the post-hatch period, which could also affect the health of the chickens at later stages of rearing and the quality of the meat obtained.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

The research material comprised 1500 hatching eggs, obtained from 36-week-old commercial broilers (Ross x Ross 308) and delivered to the Experimental Station at the Poznań University of Life Sciences (ul. Gorzyń 4, Międzychód commune). All procedures used in the research were approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval No 106/2022 of 17 October 2022).

2.1.1. Incubation of eggs

The eggs (1500) were stored at 21 °C under commercial conditions for 24 h and disinfected with Viron FF (Bielsko Biala, Poland) in a 1 ml L^{-1} solution before being placed in the incubation chamber. The eggs were randomly distributed and incubated in JARSON Model JD-18 incubators (Gostyń, Poland). From 1 to 18 days of incubation the temperature was 37.8 °C, and the relative humidity (RH) was 55–60 %. On the 19th day of incubation (DOI), the eggs were transferred to a JARSON Model ATLAS-180 hatching chamber. From days 19 to 21 in the hatching chamber the hatching parameters were 37.7–38.1 °C, RH 60–65 %. On 7 and 17 DOI, all eggs were candled and cracked, and unfertilized and dead embryonic eggs were removed.

2.1.2. In ovo administration of bioactive compounds

On day 17 of incubation, 1400 fertile eggs of similar weight were randomly divided into four groups, with 10 replicates per group and 35 eggs per replicate (350 eggs per group). The eggs in each group received an equal volume (500 μ L) of 0.9 % physiological saline or a bioactive compound, injected *in ovo* into the amniotic sac. The *in ovo* injection procedure is described in detail by Alizadeh et al., 2020, 2021 and Ciszewski et al., 2023a, 2023b. See Fig. 1. The control group (I) consisted of eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline. Group II consisted of eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU/egg *S. cerevisiae*; 1×10^7 CFU/egg *L. casei*; 1×10^7 CFU/egg *L. plantarum*). Group III consisted of eggs injected with a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate (Zn-Gly), (1×10^5 CFU/egg *S. cerevisiae*; 1×10^7 CFU/egg *L. casei*; 1×10^7 CFU/egg *L. plantarum*; 100 μ g/egg Zn-Gly). Group IV consisted of eggs injected with zinc glycine chelate (100 μ g/egg Zn-Gly).

The multi-strain probiotic used in the experiment (EM Provet) is manufactured by Greenland Technologia EM (Janowiec, Poland); its exact composition is described by Ciszewski et al. 2023a. EM Provet was diluted in PBS (phosphate-buffered saline) to obtain 100 μ L of a solution containing 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei* and 1×10^7 CFU *L. plantarum*. The Zn glycine chelate powder used in the experiment is manufactured by ARKOP Sp. z o.o. (Bukowno, Poland) and contains 250 mg Zn-Gly per g of product. Zn-Gly chelate was dissolved in deionized water to obtain solutions containing 100 μ g Zn-Gly/100 μ L milli-Q water. All procedures are described in detail by Ciszewski et al. 2023a, 2023b.

2.1.3. Birds

After hatching, 150 female birds were randomly selected from each group for further testing. The birds from each group were divided into 10 replicates of 15 birds per replicate. The rearing period was seven days. The birds were fed a basal diet with no bioactive compounds, coccidiostats or antibiotics. They received starter feed S (1–7 days) in crumble form. Food and water were available *ad libitum*. The basal diet was formulated in accordance with nutrition recommendations for Ross 308 broiler chickens (Aviagen, Broiler Nutrition Specifications, <https://aviagen.com/eu/brands/ross/products/ross-308>). Details regarding the composition and nutritional value of the feed were described by Ciszewski et al. 2023a,2023b. The experimental birds were housed under uniform, controlled environmental conditions, in accordance with the recommendations for this line. The chickens were reared in pens on wood shavings in a room with controlled temperature (31–33 °C), humidity (60 % $\pm$ 10 %), and light intensity (30–40 lux). The pens were equipped with feeding lines and nipple drinkers.

2.2. Sample collection

2.2.1. Blood

Peripheral blood samples were collected after hatching (DOH – day of hatch) from chicks killed by cervical dislocation as described by Murphy et al., 2016 (without having received feed or water) and from the wing vein at 7 days after hatching. Blood sampling was performed according to the methodology described by Kelly and Alworth, 2013 and Lumeij, 1987. The blood samples were collected in sterile vacuum tubes containing a clot activator and serum separator (Vacuette, Medlab Products, Raszyn, Poland). Blood samples were transported to the laboratory at +4 °C immediately after collection and centrifuged at room temperature (20–22 °C) for 15 min at 1000 g. Serum samples were stored at –80 °C for further analysis.

2.2.2. Tissues

Tissue samples from the liver (caudal part of the right liver lobes, approximately 1.0 $\times$ 1.0 $\times$ 1.0 cm, as described by Alshamy et al. (2019), small intestine (middle part of the ileum, 2 cm, as described by de Souza et al. (2021), pectoral muscle (excised from the superficial

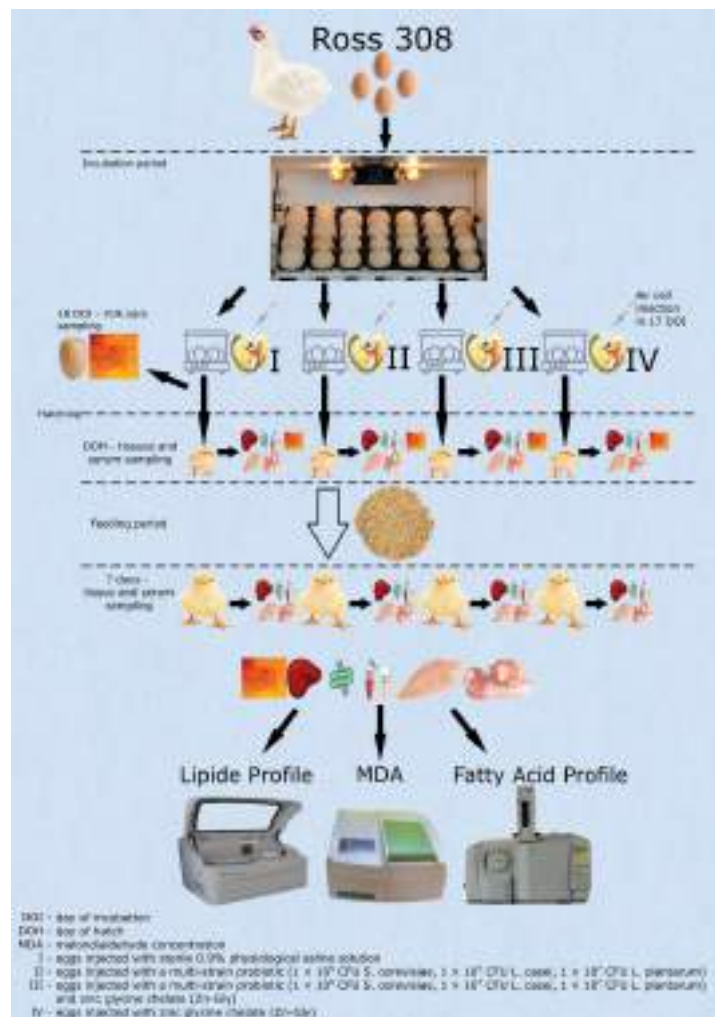


Fig. 1. Experimental flowchart.

regions of the proximal half of the left pectoralis major muscle, approximately $0.5 \times 0.5 \times 1.2$ cm, as described by Halevy et al. (2004), thigh muscle (approximately 2–4 g, $0.5 \times 0.5 \times 1.0$ cm), and yolk sac (the contents of the yolk sac were collected after its removal according to Sloan (1936) were collected at DOH from the same chickens from which the blood samples were taken. Tissues from the liver, small intestine (ileum), pectoral muscle, and thigh muscle were also collected at 7 days post-hatch. Tissue samples were collected from three birds from each replicate (30 samples in total) in each experimental group. Samples were not pooled. Serum samples were stored at -80°C for further analysis.

2.3. Fatty acid analysis and calculation of health lipid indices

Prior to chemical analyses, the tissues were thawed at room tem-

perature. Fatty acids were identified and their content was determined by gas chromatography in the INCO 505 chromatograph (Prague, Czech Republic) using Supelco 37-Component FAME MIX and Linolenic Acid Methyl Ester Isomer Mix (Sigma-Aldrich Poznań, Poland) as standards, following lipid extraction by the Folch method in the Velp SER 148 extractor (Velp, Italy) (Kwiecień et al., 2015). Fatty acids were expressed as a percentage of total fatty acids identified and categorized as saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The atherogenic (AI) and thrombogenic (TI) indices (Ulbricht and Southgate, 1991) and the hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic ratio (h/H) (Fernández et al., 2007) were calculated as follows:

Table 1

Effect of *in ovo* injection of different preparations: multi-strain probiotic and/or zinc glycine chelate on fatty acid profile (mean values $\pm$ standard deviation) and dietetic values of pectoral meat samples.

Fatty acids	Group				p-value	I 7 days				p-value
	I	II	III	IV		I	II	III	IV	
	DOH					7 days				
	Mean $\pm$ SD					Mean $\pm$ SD				
C 4:0	0.66 $\pm$ 0.12a	2.01 $\pm$ 0.19b	0.83 $\pm$ 0.1a	0.87 $\pm$ 0.1ab	0.0006	0.79 $\pm$ 0.08a	4.03 $\pm$ 0.18b	1.75 $\pm$ 0.15c	1.41 $\pm$ 0.1ac	0.0001
C 14:0	0.91 $\pm$ 0.04a	0.9 $\pm$ 0.06a	0.93 $\pm$ 0.08ab	1.05 $\pm$ 0.07b	0.01	0.85 $\pm$ 0.1a	1.13 $\pm$ 0.19ac	2.76 $\pm$ 0.3b	1.51 $\pm$ 0.29c	0.0002
C 16:0	31.43 $\pm$ 1.97	30.63 $\pm$ 2.38	30.44 $\pm$ 4.33	33.38 $\pm$ 2.97	0.4	28.66 $\pm$ 1.38a	37.49 $\pm$ 2.14b	31.66 $\pm$ 1.31ab	28.67 $\pm$ 3.67a	0.001
C 16:1 n9	2.55 $\pm$ 0.25	2.25 $\pm$ 0.52	2.7 $\pm$ 0.34	2.32 $\pm$ 0.41	0.2	5.12 $\pm$ 0.28a	5.38 $\pm$ 0.23a	2.4 $\pm$ 0.21b	4.32 $\pm$ 0.37ab	0.0002
C 18:0	8.86 $\pm$ 0.5a	16.42 $\pm$ 0.85b	10.88 $\pm$ 0.79ab	11.19 $\pm$ 0.92ab	0.0002	9.49 $\pm$ 1.06a	11.59 $\pm$ 0.69ab	11.88 $\pm$ 0.77b	10.1 $\pm$ 1.39ab	0.0009
C 18:1 n-9 cis	30.47 $\pm$ 1.05a	24.45 $\pm$ 1.26b	28.95 $\pm$ 1.95a	27.83 $\pm$ 0.81ab	0.0006	34.59 $\pm$ 1.28a	26.1 $\pm$ 0.75bc	18.82 $\pm$ 1.12b	29.26 $\pm$ 0.85ac	0.0001
C 18:1 n-9 trans	1.91 $\pm$ 0.14a	3.06 $\pm$ 0.16b	2.74 $\pm$ 0.25ab	2.64 $\pm$ 0.13ab	0.0004	3.24 $\pm$ 0.23a	0.48 $\pm$ 0.2b	2.16 $\pm$ 0.12bc	2.66 $\pm$ 0.23ac	0.0001
C 18:2 n-6	21.73 $\pm$ 1.22a	21.67 $\pm$ 0.68ab	21.86 $\pm$ 0.88a	19.73 $\pm$ 0.61b	0.007	17.86 $\pm$ 1.02ab	14.75 $\pm$ 1.21a	18.24 $\pm$ 0.81ab	21.89 $\pm$ 0.77b	0.0002
α C 18:3 n-3	1.45 $\pm$ 0.32	1.12 $\pm$ 0.22	1.22 $\pm$ 0.23	1.39 $\pm$ 0.32	0.2	1.54 $\pm$ 0.14ab	1.33 $\pm$ 0.15a	1.62 $\pm$ 0.14b	1.66 $\pm$ 0.15b	0.02
Σ SFA	41.86 $\pm$ 2.21a	49.95 $\pm$ 2.65b	43.07 $\pm$ 4.73ab	46.5 $\pm$ 3.29ab	0.008	39.79 $\pm$ 1.79a	54.24 $\pm$ 2.09c	48.06 $\pm$ 1.88abc	41.69 $\pm$ 3.61ab	0.0003
Σ MUFA	34.93 $\pm$ 1.27a	29.76 $\pm$ 1.4b	34.39 $\pm$ 1.84a	32.79 $\pm$ 0.47ab	0.0007	42.94 $\pm$ 1.2a	31.97 $\pm$ 0.9bc	23.39 $\pm$ 1.28bc	36.24 $\pm$ 1.11ac	0.0001
Σ PUFA	23.18 $\pm$ 0.92a	22.79 $\pm$ 0.7ab	23.08 $\pm$ 0.77a	21.13 $\pm$ 0.65b	0.004	19.4 $\pm$ 0.96ab	16.08 $\pm$ 1.11a	19.86 $\pm$ 0.8ab	23.55 $\pm$ 0.79b	0.0002
Σ UFA	58.11 $\pm$ 0.75a	52.55 $\pm$ 1.74b	57.48 $\pm$ 1.3ac	53.92 $\pm$ 0.42bc	0.0004	62.34 $\pm$ 1.58a	48.05 $\pm$ 1.8bc	43.25 $\pm$ 1.67b	59.79 $\pm$ 1.33ac	0.0001
Σ SFA/ Σ UFA	0.72 $\pm$ 0.04a	0.95 $\pm$ 0.03b	0.75 $\pm$ 0.09a	0.86 $\pm$ 0.06ab	0.0003	0.64 $\pm$ 0.02a	1.13 $\pm$ 0.03b	1.11 $\pm$ 0.07b	0.7 $\pm$ 0.07ab	0.0004
Σ PUFA n-3	1.45 $\pm$ 0.32	1.12 $\pm$ 0.22	1.22 $\pm$ 0.23	1.39 $\pm$ 0.32	0.2	1.54 $\pm$ 0.14ab	1.33 $\pm$ 0.15a	1.62 $\pm$ 0.14b	1.66 $\pm$ 0.15b	0.0005
Σ PUFA n-6	21.73 $\pm$ 1.22a	21.67 $\pm$ 0.68ab	21.86 $\pm$ 0.88a	19.73 $\pm$ 0.61b	0.007	17.86 $\pm$ 1.02ab	14.75 $\pm$ 1.21a	18.24 $\pm$ 0.81ab	21.89 $\pm$ 0.77b	0.0002
Σ PUFA/ Σ SFA	0.56 $\pm$ 0.03a	0.46 $\pm$ 0.02ab	0.54 $\pm$ 0.06ab	0.46 $\pm$ 0.03b	0.0005	0.49 $\pm$ 0.03ac	0.3 $\pm$ 0.01b	0.41 $\pm$ 0.02ab	0.57 $\pm$ 0.05c	0.0003
S/P	0.71 $\pm$ 0.04a	0.91 $\pm$ 0.03b	0.74 $\pm$ 0.09ac	0.85 $\pm$ 0.06abc	0.005	0.63 $\pm$ 0.02a	1.05 $\pm$ 0.03b	1.07 $\pm$ 0.07bc	0.67 $\pm$ 0.07ab	0.0001
Σ PUFA n6/n3	15.67 $\pm$ 4.02	19.79 $\pm$ 3.18	18.5 $\pm$ 4.04	14.9 $\pm$ 4.13	0.1	11.69 $\pm$ 1.45	11.31 $\pm$ 2.2	11.32 $\pm$ 1.18	13.26 $\pm$ 1.21	0.1
AI	0.6 $\pm$ 0.03a	0.65 $\pm$ 0.03ab	0.59 $\pm$ 0.08a	0.7 $\pm$ 0.06b	0.02	0.51 $\pm$ 0.02a	0.87 $\pm$ 0.03bc	0.99 $\pm$ 0.07b	0.58 $\pm$ 0.09ac	0.0002
TI	1.26 $\pm$ 0.07a	1.65 $\pm$ 0.07b	1.33 $\pm$ 0.13a	1.5 $\pm$ 0.11ab	0.0008	1.11 $\pm$ 0.03a	1.83 $\pm$ 0.05b	1.80 $\pm$ 0.1bc	1.18 $\pm$ 0.11ac	0.0005
h/H	1.66 $\pm$ 0.09a	1.5 $\pm$ 0.06ab	1.69 $\pm$ 0.26ab	1.43 $\pm$ 0.12b	0.01	1.83 $\pm$ 0.07a	1.09 $\pm$ 0.04b	1.13 $\pm$ 0.07bc	1.77 $\pm$ 0.22ac	0.0005

Abbreviations: ^{a,b,c} - lower-case letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post-hoc tests, $p \leq 0.05$. AI - atherogenic index; h/H - hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic index; TI - thrombogenic index; S/P - saturation indices; MUFA - monounsaturated fatty acid; PUFA - polyunsaturated fatty acid; SFA - saturated fatty acid; UFA - unsaturated fatty acid; DOH - day on hatch. I - control group - eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD - standard deviation. $N = 30$.

$$AI = (C12 : 0 + 4 \times C14 : 0 + C16 : 0) / \left[\sum MUFA + \sum (n-6) + \sum (n-3) \right]$$

$$TI = (C14 : 0 + C16 : 0 + C18 : 0) / \left[\left(0.5 \times \sum MUFA + 0.5 \times \sum (n-6) + 3 \times \sum (n-3) \right) + \left(\sum (n-3) / \sum (n-6) \right) \right]$$

$$h/H = (C18:1 \text{ n-9} + C18:2 \text{ n-6} + C20:4 \text{ n-6} + C18:3 \text{ n-3} + C20:5 \text{ n-3} + C22:5 \text{ n-3} + C22:6 \text{ n-3}) / (C14:0 + C16:0) \text{ (Tables 1-4)}.$$

The methods of determining the above-mentioned parameters are described in detail elsewhere (Kwiecień et al., 2014; Winiarska-Mieczan and Kwiecień, 2015; Winiarska-Mieczan et al., 2016). All chemical analyses were performed in triplicate.

2.4. Determination of malondialdehyde (MDA) concentrations in serum and tissues

The MDA concentration in tissue homogenates was assessed using a colorimetric method, with absorbance measured in the butanol layer

containing the TBA-MDA complex (TBA — thiobarbituric acid) at a wavelength of 552 nm as described in Wójcik et al. (2005). The serum concentration of MDA was measured by a spectrophotometric method described by Wessely-Szponder et al. (2015). The MDA concentration was determined using a standard curve obtained using malondialdehyde bis-dimethyl acetal. The Lowry method was used to determine the protein levels in the samples according to Maehre et al. (2018). The

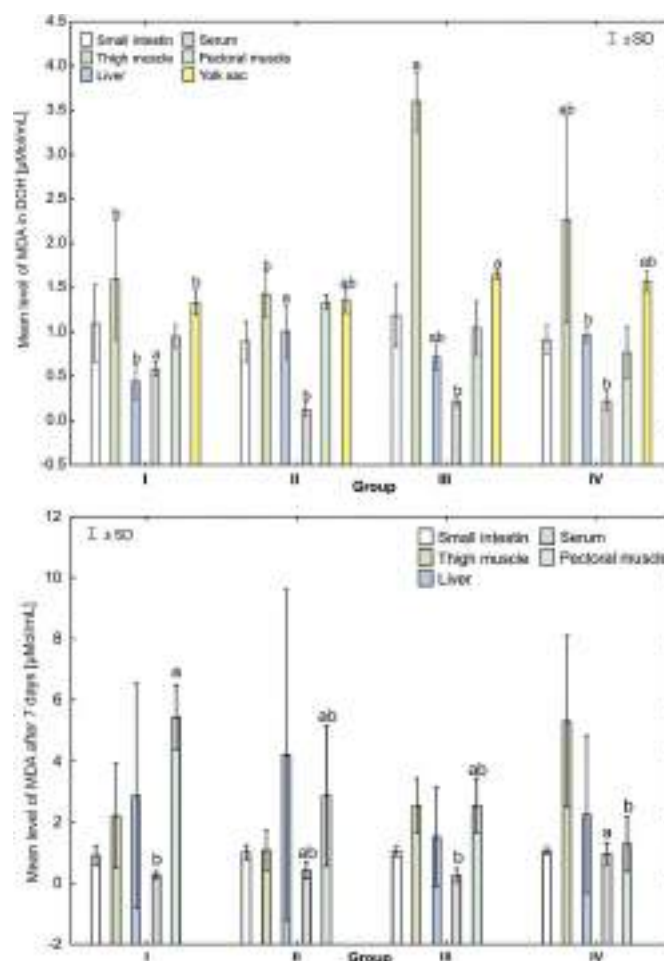


Fig. 2. Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$) for MDA ($\mu\text{Mol/mL}$) level in the serum and tissues of broiler chickens at day on hatch (DOH) and at 7 days of age. Lower case letters (a, b) were used to show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups. The same letter designations indicating no statistically significant differences. I - control group – eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD — standard deviation. $N = 30$.

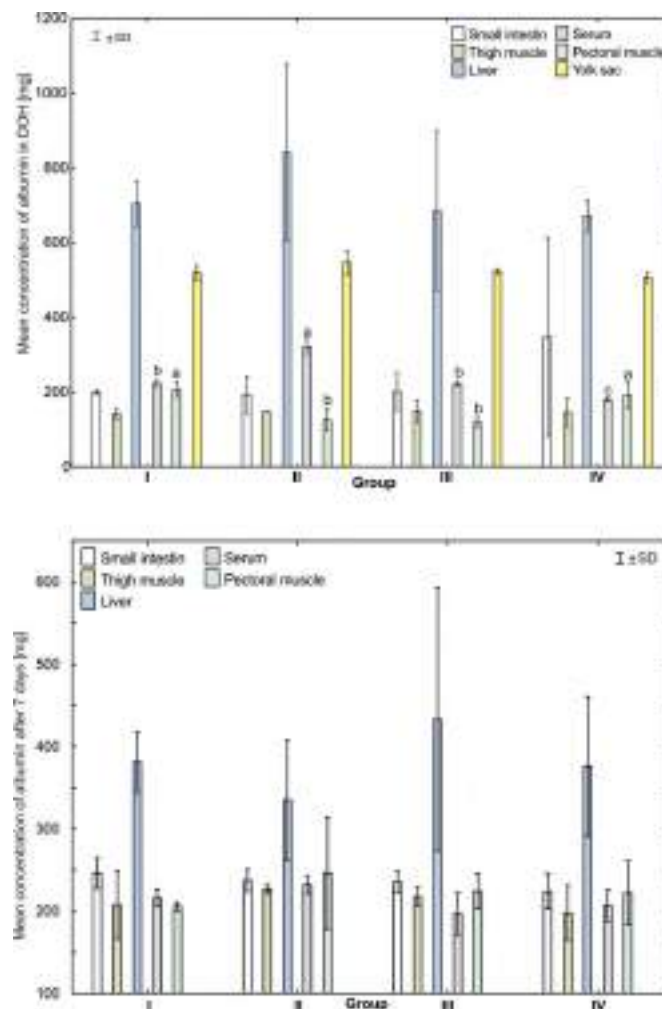


Fig. 3. Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$) for Albumin (mg) level in the serum and tissues of broiler chickens at day on hatch (DOH) and at 7 days of age. Lower case letters (a, b, c) were used to show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups. The same letter designations indicating no statistically significant differences. I - control group – eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD — standard deviation. $N = 30$.

results are presented in Figs. 2–4.

In addition, 24 h after *in ovo* supplementation with the probiotic and/or Zn-Gly chelate (18 DOI), yolk sacs were collected from three embryos from each replicate (30 samples in total) in each experimental group. The results are presented in Table 6.

2.5. Analysis of biochemical parameters in the serum of newly-hatched chicks

Serum biochemical parameters (ALAT – alanine aminotransferase; ASAT – aspartate aminotransferase; BIL D – direct bilirubin; BIL T – total bilirubin; CHOL – cholesterol; GGT – gamma-glutamyl transpeptidase; HDL D – direct high-density lipoprotein; LDL D – direct low-density lipoprotein; LIPASE – lipase; TG – triglycerides; TP – total protein; BILE ACID – bile acids; LDH – lactate dehydrogenase; and AMY – amylase) were measured using standard commercial kits (PZ Cormay S.A. Ursynów Business Park, Warsaw, Poland), following the manufacturer's

instructions, with an Accent S120 Automatic Biochemical Analyzer (PZ Cormay S.A. Ursynów Business Park, Warsaw, Poland) in the clinical laboratory of the Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, University of Life Sciences in Lublin (Lublin, Poland).

2.6. Statistical analysis

After the data were tested for normality (Shapiro–Wilk test) and homoscedasticity (Levene's test), one-way analysis of variance (ANOVA) of the data sets was performed for experimental groups I–IV, followed by Tukey's test for mean fatty acid levels or the non-parametric Kruskal–Wallis test for mean MDA and albumin levels. Results were expressed as mean and $\pm$ standard deviation ($\pm$ SD), and differences were considered significant at $p \leq 0.05$. The statistical analyses were performed using Statistica 13.2 software (StatSoft, Inc., Krakow, Poland). The results are presented in Figs. 2–4 and Tables 1–6.

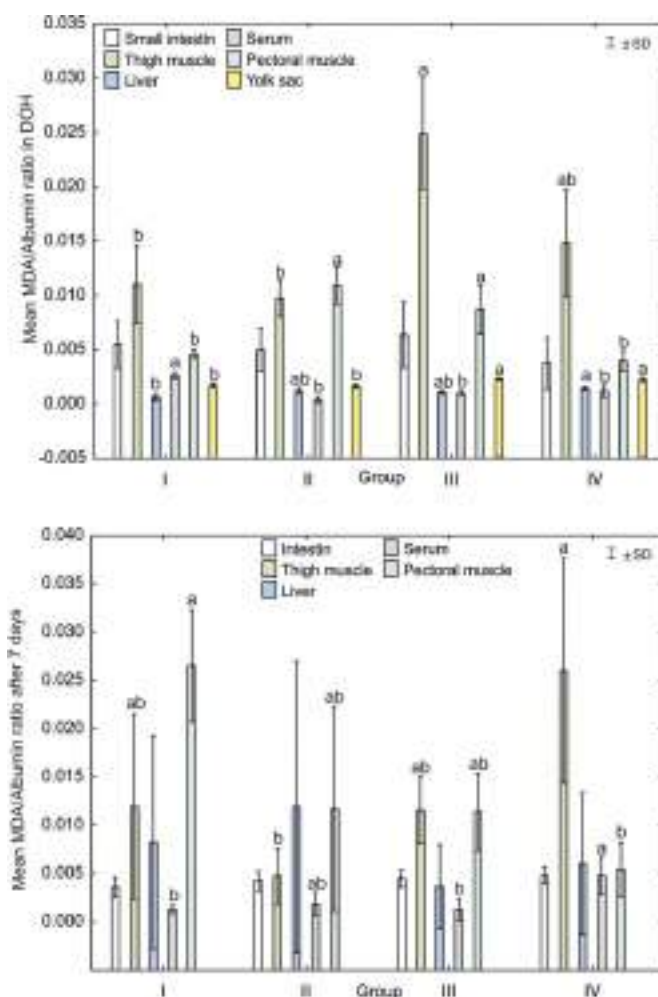


Fig. 4. Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$) for MDA/Albumin ratio in the serum and tissues of broiler chickens at day on hatch (DOH) and at 7 days of age. Lower case letters (a, b) were used to show statistically significant results ($p \leq 0.05$) between groups. The same letter designations indicating no statistically significant differences. I - control group – eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD — standard deviation. $N = 30$.

3. Results

3.1. Fatty acid analysis and calculation of health lipid indices in pectoral muscle samples

Statistically significant differences were observed in the profile of fatty acids and their sums in pectoral muscle samples from birds on both the first day of life (DOH) and at 7 days post-hatch, with the exception of the C 16:0 profile, C 16:1 n-9, α C 18:3 n-3, and Σ n-3 PUFAs at DOH and the Σ PUFA n6/n3 ratio on both sampling days. At DOH, the C 4:0 content was statistically significantly higher in group II than in groups I and III, while there were no statistically significant differences for this acid between group IV and the other groups. Similarly, at 7 days post-hatch, the C 4:0 level was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II than in the control group (I) and group III, whereas the level of C 4:0 in group IV was statistically significantly lower than in group II but did not differ statistically significantly from groups I and III. At DOH, the C 14:0 level was statistically significant higher ($p \leq 0.05$) in group IV

than in groups I and II. At 7 days post-hatch, C 14:0 levels were statistically significantly higher in group III than in the other groups. C 14:0 levels were statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in the control group (I) than in groups III and IV. No statistically significant differences were observed in the levels of C 16:0 or C 16:1 n9 in the pectoral muscle at day of hatch (DOH). After 7 days, the C 16:0 level in group II was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in groups I and IV but did not differ statistically significantly from group III. The C 16:1 n9 level at 7 days post-hatch was statistically significantly ($p \leq 0.05$) lower in group III than in groups I and II, while no statistically significant differences were observed between groups III and IV.

At DOH, there were statistically significant differences in the level of C18 octadecanoic acids, except for α C 18:3 n-3. The level of C 18:0 acid in the control group (I) was statistically significantly ($p \leq 0.05$) lower than in group II but did not differ significantly from the levels in groups III and IV. The level of C 18:1 n-9 *cis* oleic acid was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group I than in group II, whereas the level of C 18:2 n-6 acid was statistically significantly lower in the control group

Table 2

Effect of *in ovo* injection of different preparations: multi-strain probiotic and/or zinc glycine chelate on fatty acid profile (mean values $\pm$ standard deviation) and dietetic values of thigh meat samples.

Fatty acids	Group					p-value	I					p-value
	I	II	III	IV	I		II	III	IV			
	DOH				7 days							
	Mean ± SD					Mean ± SD						
C 4:0	0.51 ± 0.05a	0.76 ± 0.17a	0.19 ± 0.06ac	0.12 ± 0.04bc	0.02	0.46 ± 0.06ac	0.32 ± 0.05bc	0.34 ± 0.07abc	0.32 ± 0.05b	0.0002		
C 14:0	0.88 ± 0.13	0.84 ± 0.08	0.74 ± 0.07	0.69 ± 0.14	0.4	0.93 ± 0.12	0.84 ± 0.07	0.84 ± 0.13	0.93 ± 0.13	0.4		
C 16:0	31.45 ± 4.13	29.64 ± 3.8	27.18 ± 1.83	26.52 ± 2.33	0.1	23.65 ± 3.91	27.50 ± 1.14	28.06 ± 1.47	25.82 ± 1.01	0.3		
C 16:1 n9	3.34 ± 0.44a	1.99 ± 0.38b	2.75 ± 0.59ab	3.2 ± 0.39ab	0.0002	7.4 ± 0.31a	4.93 ± 0.45b	6.43 ± 0.38ab	6.21 ± 0.18a	0.004		
C 18:0	8.55 ± 0.71a	9.78 ± 0.72b	7.52 ± 0.9ab	7.86 ± 0.46ab	0.003	5.64 ± 0.68ab	7.25 ± 0.57a	6.87 ± 1.02b	6.26 ± 0.28b	0.002		
C 18:1 n-9 cis	31.25 ± 1.59a	29.4 ± 1.06ab	30.43 ± 0.71b	32.5 ± 1.3ab	0.03	34.64 ± 0.78ab	35.67 ± 1.08a	36.35 ± 1.03ab	35.83 ± 0.65b	0.008		
C 18:1 n-9 trans	2.0 ± 0.17a	2.27 ± 0.21b	1.88 ± 0.1ab	2.13 ± 0.22b	0.004	3.11 ± 0.18ab	2.55 ± 0.15a	2.65 ± 0.27b	2.65 ± 0.12ab	0.02		
C 18:2 n-6	20.5 ± 0.63a	24.57 ± 0.98ab	26.6 ± 0.83b	24.62 ± 0.49a	0.0003	22.62 ± 1.43a	19.77 ± 0.88ab	17.43 ± 0.85b	20.62 ± 1.11ab	0.0003		
α C 18:3 n-3	1.14 ± 0.24a	1.31 ± 0.34b	1.62 ± 0.25b	1.32 ± 0.11ab	0.001	2.03 ± 0.16a	1.47 ± 0.1ab	1.45 ± 0.17b	1.66 ± 0.14ab	0.04		
Σ SFA	41.40 ± 4.76a	41.02 ± 3.71b	35.64 ± 2.54ab	35.2 ± 2.36ab	0.01	30.68 ± 3.93	35.91 ± 1.47	36.1 ± 2.36	33.33 ± 1.05	0.1		
Σ MUFA	36.59 ± 1.26ab	33.66 ± 1.23a	35.07 ± 0.99b	37.83 ± 1.45ab	0.04	45.14 ± 0.89a	43.15 ± 1.48b	45.44 ± 0.81abc	44.69 ± 0.6ac	0.001		
Σ PUFA	21.65 ± 0.49a	25.87 ± 1.0ab	28.22 ± 0.97b	25.94 ± 0.44a	0.0002	24.65 ± 1.44a	21.25 ± 0.89ab	18.89 ± 0.92b	22.27 ± 1.15ab	0.0003		
Σ UFA	58.23 ± 1.16a	59.53 ± 1.83b	63.29 ± 1.01b	63.77 ± 1.22ab	0.0006	69.79 ± 1.64a	64.4 ± 1.63ac	64.32 ± 1.28bc	66.96 ± 1.12bc	0.0007		
Σ SFA/ Σ UFA	0.71 ± 0.07a	0.69 ± 0.05b	0.56 ± 0.03b	0.55 ± 0.03ab	0.0004	0.44 ± 0.05a	0.56 ± 0.02ac	0.56 ± 0.04bc	0.5 ± 0.02b	0.0009		
Σ PUFA n-3	1.14 ± 0.24a	1.31 ± 0.34b	1.62 ± 0.25b	1.32 ± 0.11ab	0.001	2.03 ± 0.16a	1.47 ± 0.1ab	1.45 ± 0.17b	1.66 ± 0.14ab	0.04		
Σ PUFA n-6	20.50 ± 0.63a	24.57 ± 0.98ab	26.6 ± 0.83b	24.62 ± 0.49a	0.0003	22.62 ± 1.43a	19.77 ± 0.88ab	17.43 ± 0.85b	20.62 ± 1.11ab	0.0003		
Σ PUFA/ Σ SFA	0.53 ± 0.08a	0.63 ± 0.05a	0.79 ± 0.05b	0.74 ± 0.05b	0.0004	0.81 ± 0.07a	0.59 ± 0.03ac	0.53 ± 0.05b	0.67 ± 0.05bc	0.0009		
S/P	0.70 ± 0.07a	0.68 ± 0.05b	0.56 ± 0.03b	0.55 ± 0.03ab	0.0001	0.43 ± 0.05a	0.55 ± 0.02ac	0.56 ± 0.04bc	0.49 ± 0.02b	0.0004		
Σ PUFA n6/n3	18.58 ± 3.74a	19.96 ± 5.59b	16.68 ± 2.48ab	18.81 ± 1.71ab	0.03	11.22 ± 1.18	13.46 ± 1	12.11 ± 1.3	12.5 ± 1.06	0.5		
AI	0.6 ± 0.06a	0.55 ± 0.05a	0.48 ± 0.02b	0.46 ± 0.04b	0.0007	0.39 ± 0.05a	0.48 ± 0.01b	0.49 ± 0.02b	0.44 ± 0.02ab	0.002		
TI	1.27 ± 0.12a	1.22 ± 0.1a	0.99 ± 0.06b	1.0 ± 0.06b	0.0003	0.75 ± 0.08a	0.99 ± 0.03b	1.0 ± 0.08b	0.88 ± 0.04ab	0.001		
h/H	1.66 ± 0.19a	1.83 ± 0.19a	2.11 ± 0.13b	2.16 ± 0.17b	0.001	2.46 ± 0.37a	2.01 ± 0.07ab	1.91 ± 0.09b	2.18 ± 0.11a	0.002		

Abbreviations: a,b,c - lower-case letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post-hoc tests, $p \leq 0.05$. AI - atherogenic index; h/H - hypocholesterolemic/hypercholesterolemic index; TI - thrombogenic index; S/P - saturation indices; MUFA - monounsaturated fatty acid; PUFA - polyunsaturated fatty acid; SFA - saturated fatty acid; UFA - unsaturated fatty acid; DOH - day on hatch. I - control group - eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD - standard deviation. $N = 30$.

(I) than in group II. There were no statistically significant differences in the level of either of these acids between the control group (I) and groups III and IV. Compared to the control group (I), the level of C 18:0 acid after seven days was statistically significantly ($p \leq 0.05$) higher in group III. The levels of C 18:1 n-9 *cis* and C 18:1 n-9 *trans* in the control group (I) at 7 days post-hatch were statistically significantly higher than in groups II and III but did not differ statistically significantly compared to group IV. The level of C 18:2 n-6 was statistically significantly higher in group IV than in group II, while the level of α C 18:3 n-3 was statistically significantly lower in group II than in groups III and IV.

The level of monounsaturated fatty acids (MUFAs) in group II at DOH was statistically significantly lower than in groups I and III but did not differ statistically significantly from group IV. The sum of saturated fatty acids (Σ SFA) in group II at DOH was statistically significantly higher than in the control group (I) but did not differ statistically significantly

from groups III and IV. The sum of unsaturated fatty acids (Σ UFA) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in the control group (I) than in groups II and IV. The levels of Σ MUFA and Σ UFA were also statistically significantly lower in groups II and III than in the control group (I) at 7 days post-hatch. In addition, Σ UFA was statistically significantly higher in group IV than in group III. The Σ PUFA level at 7 days post-hatch was statistically significantly higher in group IV than in group II, while no significant differences were observed in the remaining groups. The Σ SFA/ Σ UFA ratio in the control group (I) was statistically significantly lower than in group II at DOH and in comparison to groups II and III at 7 days post-hatch. At 7 days post-hatch, Σ PUFA n-3 was statistically significantly higher in groups III and IV than in group II, whereas Σ PUFA n-6 was statistically significantly higher in groups I and III than in group IV at DOH and statistically significantly higher in group IV than in group II.

Table 3

Effect of *in ovo* injection of different preparations: multi-strain probiotic and/or zinc glycine chelate on fatty acid profile (mean values $\pm$ standard deviation) and dietetic values of liver samples.

Fatty acids	Group				p-value					p-value
	I	II	III	IV		I	II	III	IV	
	DOH					7 days				
	Mean $\pm$ SD					Mean $\pm$ SD				
C 4:0	0.68 $\pm$ 0.13abc	0.45 $\pm$ 0.08a	2.07 $\pm$ 0.13b	0.6 $\pm$ 0.08ac	0.0004	0.94 $\pm$ 0.07a	0.69 $\pm$ 0.07ab	0.07 $\pm$ 0.02b	0.65 $\pm$ 0.07ab	0.0002
C 14:0	0.48 $\pm$ 0.15	0.62 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.06	0.06	0.84 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.12	0.79 $\pm$ 0.15	0.09
C 16:0	17.90 $\pm$ 1.47ab	26.28 $\pm$ 1.44a	15.48 $\pm$ 2.51b	15.61 $\pm$ 2.52b	0.002	23.13 $\pm$ 2.06a	29 $\pm$ 0.99b	26.55 $\pm$ 1.24ab	25.39 $\pm$ 1.35a	0.0006
C 16:1 n-9	3.0 $\pm$ 0.48ab	5.69 $\pm$ 0.79a	1.66 $\pm$ 0.25b	2.74 $\pm$ 0.24ab	0.0002	3.69 $\pm$ 0.21a	4.32 $\pm$ 0.44ab	5.75 $\pm$ 0.44b	3.88 $\pm$ 0.24a	0.0006
C 18:0	10.45 $\pm$ 0.49	9.88 $\pm$ 1.02	10.21 $\pm$ 1.01	8.98 $\pm$ 1	0.06	12.22 $\pm$ 0.85ab	13.4 $\pm$ 0.75a	8.08 $\pm$ 1.06b	12.11 $\pm$ 0.86ab	0.0009
C 18:1 n-9 cis	50.3 $\pm$ 2.61a	46.92 $\pm$ 0.85ab	41.48 $\pm$ 0.61b	51.23 $\pm$ 0.68ab	0.0002	40.63 $\pm$ 0.68ab	38.67 $\pm$ 1.39a	40.33 $\pm$ 0.67ab	41.56 $\pm$ 0.7b	0.0035
C 18:1 n-9 trans	1.38 $\pm$ 0.19ab	1.12 $\pm$ 0.1a	1.64 $\pm$ 0.28b	1.58 $\pm$ 0.09b	0.04	2.24 $\pm$ 0.15a	2.77 $\pm$ 0.16ab	2.86 $\pm$ 0.27b	2.85 $\pm$ 0.27b	0.04
C 18:2 n-6	11.28 $\pm$ 0.9ac	6.6 $\pm$ 0.49ac	19.62 $\pm$ 1.1b	13.51 $\pm$ 0.77ab	0.0001	13.22 $\pm$ 1.23ab	10.57 $\pm$ 0.87a	13.9 $\pm$ 1.69b	13.65 $\pm$ 1.48b	0.007
α C 18:3 n-3	1.12 $\pm$ 0.13	1.35 $\pm$ 0.21	1.23 $\pm$ 0.36	1.12 $\pm$ 0.29	0.007	1.1 $\pm$ 0.1	1.12 $\pm$ 0.14	1.19 $\pm$ 0.09	1.18 $\pm$ 0.08	0.0002
Σ SFA	29.52 $\pm$ 1.61ab	37.23 $\pm$ 1.75a	28.27 $\pm$ 2.55b	25.67 $\pm$ 2.58b	0.001	37.13 $\pm$ 2.02a	43.96 $\pm$ 1.05b	35.35 $\pm$ 1.3a	38.94 $\pm$ 2.1ab	0.0005
Σ MUFA	54.68 $\pm$ 2.8a	53.73 $\pm$ 1.4ab	44.78 $\pm$ 0.8b	55.56 $\pm$ 0.95a	0.0012	46.56 $\pm$ 0.88a	45.76 $\pm$ 1.83a	48.93 $\pm$ 1.05b	48.28 $\pm$ 0.77ab	0.003
Σ PUFA	12.4 $\pm$ 0.87ac	7.95 $\pm$ 0.51a	20.84 $\pm$ 1.15b	14.63 $\pm$ 0.86c	0.0001	14.32 $\pm$ 1.23ab	11.69 $\pm$ 0.95a	15.09 $\pm$ 1.72b	14.83 $\pm$ 1.52b	0.008
Σ UFA	67.08 $\pm$ 3.38a	61.69 $\pm$ 1.39b	65.62 $\pm$ 1.61ab	70.19 $\pm$ 1.47a	0.0007	60.88 $\pm$ 1.46ab	57.45 $\pm$ 2.7a	64.03 $\pm$ 2.38b	63.12 $\pm$ 1.89b	0.004
Σ SFA/ Σ UFA	0.44 $\pm$ 0.02ab	0.60 $\pm$ 0.04a	0.43 $\pm$ 0.03b	0.37 $\pm$ 0.04ab	0.0003	0.61 $\pm$ 0.03ab	0.77 $\pm$ 0.04a	0.55 $\pm$ 0.04b	0.62 $\pm$ 0.02ab	0.0003
Σ PUFA n-3	1.12 $\pm$ 0.13	1.35 $\pm$ 0.21	1.23 $\pm$ 0.36	1.12 $\pm$ 0.29	0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.12 $\pm$ 0.14	1.19 $\pm$ 0.09	1.18 $\pm$ 0.08	0.4
Σ PUFA n-6	11.28 $\pm$ 0.9ac	6.6 $\pm$ 0.49a	19.62 $\pm$ 1.1b	13.51 $\pm$ 0.77bc	0.0001	13.22 $\pm$ 1.23abc	10.57 $\pm$ 0.87a	13.9 $\pm$ 1.69b	13.65 $\pm$ 1.48b	0.007
Σ PUFA/ Σ SFA	0.42 $\pm$ 0.03ac	0.21 $\pm$ 0.02a	0.74 $\pm$ 0.04b	0.58 $\pm$ 0.08bc	0.0003	0.39 $\pm$ 0.03a	0.27 $\pm$ 0.02b	0.43 $\pm$ 0.06a	0.38 $\pm$ 0.03ab	0.0003
S/P	0.43 $\pm$ 0.02ab	0.6 $\pm$ 0.04a	0.4 $\pm$ 0.04b	0.36 $\pm$ 0.04b	0.0001	0.59 $\pm$ 0.03ab	0.75 $\pm$ 0.04a	0.55 $\pm$ 0.04b	0.61 $\pm$ 0.02ab	0.002
Σ PUFA n6/n3	10.16 $\pm$ 1.5ab	4.99 $\pm$ 0.96a	17.32 $\pm$ 5.68b	12.84 $\pm$ 3.7b	0.0007	12.12 $\pm$ 1.59ab	9.57 $\pm$ 1.07a	11.68 $\pm$ 1.56b	11.54 $\pm$ 1.2ac	0.02
AI	0.3 $\pm$ 0.01ab	0.47 $\pm$ 0.03a	0.27 $\pm$ 0.04b	0.25 $\pm$ 0.04b	0.002	0.44 $\pm$ 0.04a	0.57 $\pm$ 0.02b	0.46 $\pm$ 0.03ab	0.45 $\pm$ 0.02a	0.004
TI	0.79 $\pm$ 0.03ab	1.07 $\pm$ 0.07a	0.73 $\pm$ 0.06b	0.66 $\pm$ 0.07b	0.0003	1.09 $\pm$ 0.06ab	1.37 $\pm$ 0.09a	1.01 $\pm$ 0.06b	1.11 $\pm$ 0.05ab	0.0006
h/H	3.42 $\pm$ 0.24abc	2.05 $\pm$ 0.15a	3.98 $\pm$ 0.6bc	4.18 $\pm$ 0.65bc	0.001	2.31 $\pm$ 0.21a	1.69 $\pm$ 0.08b	2.04 $\pm$ 0.16ab	2.16 $\pm$ 0.07a	0.001

Abbreviations: ^{a,b,c} - lower-case letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post-hoc tests, $p \leq 0.05$. AI - atherogenic index; h/H - hypocholesterolemic/hypercholesterolemic index; TI - thrombogenic index; S/P - saturation indices; MUFA - monounsaturated fatty acid; PUFA - polyunsaturated fatty acid; SFA - saturated fatty acid; UFA - unsaturated fatty acid; DOH – day on hatch. I - control group – eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD - standard deviation. $N = 30$.

The atherogenic index (AI) at DOH was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in groups I and III than in group IV, and the thrombogenic index (TI) on the same day was statistically significantly lower in group I than in group II. In the remaining groups, no statistically significant differences were observed in the AI or TI values at DOH. At 7 days post-hatch, the AI and TI values were statistically significantly lower in the control group (I) than in groups III and II. The h/H and Σ PUFA/ Σ SFA ratios at DOH were statistically significantly higher in group I than in group IV. At 7 days post-hatch, the h/H and Σ PUFA/ Σ SFA ratios in group II were statistically significantly lower than in groups I and III and in groups I and IV, respectively. At DOH, the saturation ratio (S/P) in group II was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in groups I and III, while at 7 days post-hatch, the saturation ratios (S/P) in groups II and III were statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in the control group (I). See Table 1.

3.2. Fatty acid analysis and calculation of health lipid indices in thigh muscle samples

Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were observed in the content of fatty acids in the thigh muscle between the experimental groups, both at DOH and at 7 days post-hatch, except for C 14:0 and C 16:0 on both days of the study and Σ SFA and the Σ PUFA n6/n3 ratio at 7 days post-hatch. The content of octadecanoic acid (C 18:0) in group II was statistically significantly higher than in group I at DOH and in comparison to groups III and IV at 7 days post-hatch. The level of C 18:1 n-9 cis (oleic acid) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in the control group (I) compared to group III at DOH and in group IV compared to group II at 7 days post-hatch. The levels ($p \leq 0.05$) of unsaturated fatty acids (Σ MUFA, Σ PUFA and Σ UFA) at DOH were statistically significantly higher in group III than in groups II, I and IV, respectively. At 7 days post-hatch, the sum of MUFAs in the control

Table 4

Effect of *in ovo* injection of different preparations: multi-strain probiotic and/or zinc glycine chelate on fatty acid profile (mean values $\pm$ standard deviation) and dietetic values of small intestine samples.

Fatty acids	Group					p-value						p-value
	I	II	III	IV	I		II	III	IV			
	DOH				7 days							
	Mean $\pm$ SD				Mean $\pm$ SD							
C 4:0	1.23 $\pm$ 0.2ab	0.87 $\pm$ 0.08a	1.18 $\pm$ 0.16ab	2.0 $\pm$ 0.14b	0.0003	0.5 $\pm$ 0.03a	1.67 $\pm$ 0.13b	0.25 $\pm$ 0.05c	0.72 $\pm$ 0.07ab	0.0001		
C 14:0	0.85 $\pm$ 0.09	0.8 $\pm$ 0.06	0.9 $\pm$ 0.17	0.92 $\pm$ 0.16	0.3	1.08 $\pm$ 0.08a	0.97 $\pm$ 0.11ab	0.86 $\pm$ 0.15ab	0.78 $\pm$ 0.05b	0.002		
C 16:0	18.12 $\pm$ 1.6a	18.38 $\pm$ 1.19a	20.11 $\pm$ 2.3ab	21.63 $\pm$ 1.42b	0.007	32.05 $\pm$ 2.61a	35.65 $\pm$ 1.37a	22.32 $\pm$ 1.8b	30.26 $\pm$ 0.99ab	0.0004		
C 16:1 n9	1.78 $\pm$ 0.27a	1.76 $\pm$ 0.31a	2.87 $\pm$ 0.28b	2.70 $\pm$ 0.25b	0.0006	7.34 $\pm$ 0.59a	4.79 $\pm$ 0.32b	4.99 $\pm$ 0.19b	5.75 $\pm$ 0.37ab	0.0002		
C 18:0	12.16 $\pm$ 0.6	11.34 $\pm$ 0.67	12.36 $\pm$ 0.52	11.46 $\pm$ 1.28	0.08	8.51 $\pm$ 0.75a	13.36 $\pm$ 1.12b	7.85 $\pm$ 0.69a	10.44 $\pm$ 0.62ab	0.0002		
C 18:1 n-9 cis	20.91 $\pm$ 1.4a	22.51 $\pm$ 1.22ab	23.72 $\pm$ 2.02ab	25.06 $\pm$ 1.36b	0.04	34.32 $\pm$ 0.9a	28.02 $\pm$ 1.44b	29.48 $\pm$ 0.91ab	35.49 $\pm$ 0.55ac	0.0002		
C 18:1 n-9 trans	2.12 $\pm$ 0.17a	2.5 $\pm$ 0.13ab	3.01 $\pm$ 0.57b	2.94 $\pm$ 0.25b	0.001	3.07 $\pm$ 0.14ab	3.0 $\pm$ 0.28ab	2.67 $\pm$ 0.27a	3.15 $\pm$ 0.13b	0.03		
C 18:2 n-6	31.11 $\pm$ 0.91ac	32.35 $\pm$ 1.05a	27.57 $\pm$ 1.07cb	25.99 $\pm$ 1.55b	0.0002	13.08 $\pm$ 0.93a	13.41 $\pm$ 0.77a	26.43 $\pm$ 1.34b	13.46 $\pm$ 0.73a	0.004		
α C 18:3 n-3	1.41 $\pm$ 0.12	1.29 $\pm$ 0.07	1.21 $\pm$ 0.09	1.23 $\pm$ 0.16	0.08	1.57 $\pm$ 0.11	1.64 $\pm$ 0.1	1.67 $\pm$ 0.11	1.58 $\pm$ 0.11	0.4		
Σ SFA	32.36 $\pm$ 1.55ab	31.4 $\pm$ 1.4a	34.55 $\pm$ 2.68ab	36.02 $\pm$ 2.33b	0.009	42.14 $\pm$ 2.69ab	51.65 $\pm$ 1.78a	31.28 $\pm$ 1.71b	42.2 $\pm$ 1.47ab	0.0002		
Σ MUFA	24.81 $\pm$ 1.37a	26.77 $\pm$ 1.3ab	29.6 $\pm$ 1.72b	30.7 $\pm$ 1.62b	0.0007	44.72 $\pm$ 1.34a	35.82 $\pm$ 1.21b	37.14 $\pm$ 1.2bc	44.39 $\pm$ 0.56ac	0.0004		
Σ PUFA	32.52 $\pm$ 0.88ac	33.65 $\pm$ 1.03a	28.78 $\pm$ 1.04c	27.22 $\pm$ 1.64bc	0.0003	14.64 $\pm$ 0.94a	15.05 $\pm$ 0.84ab	28.1 $\pm$ 1.44b	15.04 $\pm$ 0.73a	0.003		
Σ UFA	57.32 $\pm$ 1.46a	60.42 $\pm$ 0.99b	58.39 $\pm$ 1.97ab	57.92 $\pm$ 2.53ab	0.02	59.37 $\pm$ 2.23ab	50.88 $\pm$ 1.95a	65.24 $\pm$ 2.62b	59.43 $\pm$ 0.92ab	0.0003		
Σ SFA/ Σ UFA	0.56 $\pm$ 0.02ab	0.52 $\pm$ 0.03a	0.59 $\pm$ 0.05ab	0.62 $\pm$ 0.03b	0.003	0.71 $\pm$ 0.06ab	1.02 $\pm$ 0.03a	0.48 $\pm$ 0.03b	0.71 $\pm$ 0.02ab	0.0002		
Σ PUFA n-3	1.41 $\pm$ 0.12	1.29 $\pm$ 0.07	1.21 $\pm$ 0.09	1.23 $\pm$ 0.16	0.08	1.57 $\pm$ 0.11	1.64 $\pm$ 0.1	1.67 $\pm$ 0.11	1.58 $\pm$ 0.11	0.4		
Σ PUFA n-6	31.11 $\pm$ 0.91ac	32.35 $\pm$ 1.05a	27.57 $\pm$ 1.07bc	25.99 $\pm$ 1.55b	0.0002	13.08 $\pm$ 0.93a	13.41 $\pm$ 0.77a	26.43 $\pm$ 1.34b	13.46 $\pm$ 0.73a	0.04		
Σ PUFA/ Σ SFA	1.01 $\pm$ 0.05ac	1.07 $\pm$ 0.08a	0.84 $\pm$ 0.07bc	0.76 $\pm$ 0.06b	0.003	0.35 $\pm$ 0.04ab	0.29 $\pm$ 0.01a	0.9 $\pm$ 0.07b	0.36 $\pm$ 0.01ab	0.0002		
S/P	0.54 $\pm$ 0.02ab	0.51 $\pm$ 0.03a	0.57 $\pm$ 0.05ab	0.59 $\pm$ 0.03b	0.0004	0.7 $\pm$ 0.06ab	0.98 $\pm$ 0.03a	0.48 $\pm$ 0.03b	0.7 $\pm$ 0.02ab	0.0003		
Σ PUFA n6/n3	22.27 $\pm$ 2.38ab	25.14 $\pm$ 1.86a	22.82 $\pm$ 2.22ab	21.32 $\pm$ 2.73b	0.04	8.38 $\pm$ 0.76a	8.18 $\pm$ 0.37a	15.83 $\pm$ 0.51b	8.56 $\pm$ 0.84a	0.004		
AI	0.38 $\pm$ 0.03ab	0.36 $\pm$ 0.02a	0.41 $\pm$ 0.04ab	0.44 $\pm$ 0.03b	0.006	0.61 $\pm$ 0.06a	0.78 $\pm$ 0.03ac	0.4 $\pm$ 0.03b	0.56 $\pm$ 0.01ab	0.003		
TI	0.97 $\pm$ 0.05ab	0.91 $\pm$ 0.05a	1.04 $\pm$ 0.09ab	1.06 $\pm$ 0.06b	0.006	1.24 $\pm$ 0.11ab	1.69 $\pm$ 0.04a	0.84 $\pm$ 0.06b	1.23 $\pm$ 0.03ab	0.0002		
h/H	2.83 $\pm$ 0.21a	2.94 $\pm$ 0.22a	2.52 $\pm$ 0.27ab	2.32 $\pm$ 0.13b	0.002	1.49 $\pm$ 0.15ac	1.18 $\pm$ 0.06a	2.5 $\pm$ 0.25bc	1.63 $\pm$ 0.04bc	0.0001		

Abbreviations: a,b,c - lower-case letters indicate differences shown in Kruskal–Wallis ANOVA and post-hoc tests, $p \leq 0.05$. AI - atherogenic index; h/H - hypocholesterolemic/hypercholesterolemic index; TI - thrombogenic index; S/P - saturation indices; MUFA - monounsaturated fatty acid; PUFA - polyunsaturated fatty acid; SFA - saturated fatty acid; UFA - unsaturated fatty acid; DOH - day on hatch. I - control group - eggs injected with sterile 0.9 % physiological saline solution; group II - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*); group III - eggs injected with a multi-strain probiotic (1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, 1×10^7 CFU *L. plantarum*) and zinc glycine chelate (Zn-Gly); group IV - eggs injected with zinc glycine chelate (Zn-Gly). $\pm$ SD - standard deviation. $N = 30$.

group (I) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in group II but did not differ statistically significantly from the other groups. On the same day, the sum of PUFAs in the control group (I) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in group III but did not differ statistically significantly from the other groups, whereas the sum of UFAs in the control group (I) was statistically significantly higher than in groups III and IV. No statistically significant differences were observed in the remaining experimental groups. At DOH, the Σ SFA/ Σ UFA ratio was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in groups II and III than in the control group (I). However, at 7 days post-hatch, the ratio was statistically significantly lower in the control group (I) than in groups III and IV, in which the Σ SFA/ Σ UFA ratios were statistically significantly lower than in group II. At DOH, Σ PUFA n-3 in the thigh meat sample was statistically significantly lower in the control group (I) than in groups II and III. Moreover, Σ PUFA n-6 at DOH was statistically significantly

lower in the control group (I) than in group III. At 7 days post-hatch, the sums of n-3 PUFAs and n-6 PUFAs in group III were statistically significantly lower than in the control group but did not differ statistically significantly from the other experimental groups. At DOH, the Σ PUFA/ Σ SFA ratio was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in thigh meat samples from groups III and IV than in groups I and II, while at 7 days post-hatch, the corresponding values were statistically significantly higher in groups I and IV than in groups II and III. At DOH, the saturation index (S/P) value was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in thigh meat samples from the control group (I) than in the supplemented groups. S/P values at 7 days post-hatch were statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in groups III and IV than in the control group (I). The Σ PUFA n6/n3 ratio in group II at DOH was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in the control group (I) but did not differ statistically significantly from the other supplemented groups. At 7 days post-

Table 5

Comparison of the level of selected biochemical parameters for the control group (I) and experimental groups (II-III) using one-way ANOVA. The results are presented using means values and standard deviation ($\pm$ SD). The same letters mean no statistical differences. The level of significance was marked: ns – statistically insignificant difference; significant differences: * for $p \leq 0.05$; ** for $p \leq 0.001$; *** for $p \leq 0.0001$.

Parameter	Group							
	I DOH	II	III	IV	I 7 days	II	III	IV
ALAT	1.23 $\pm$ 0.37ns	1.47 $\pm$ 0.39ns	1.10 $\pm$ 0.18ns	1.10 $\pm$ 0.3ns	0.90 $\pm$ 0.49a*	0.40 $\pm$ 0.15b*	0.37 $\pm$ 0.19b*	0.63 $\pm$ 0.27ab*
ASAT	184.13 $\pm$ 12.84a*	189.53 $\pm$ 3.99ab*	188.27 $\pm$ 17.97ab*	206.90 $\pm$ 7.24b*	240.1 $\pm$ 7.12ab**	230.45 $\pm$ 7.81a**	229.1 $\pm$ 14.99a**	251.9 $\pm$ 13.85b**
BIL D	0.03 $\pm$ 0.01ns	0.02 $\pm$ 0.01ns	0.03 $\pm$ 0.01ns	0.03 $\pm$ 0.02ns	0.07 $\pm$ 0.01a***	0.03 $\pm$ 0.01b***	0.02 $\pm$ 0.01b***	0.05 $\pm$ 0.01c***
BIL T	1.94 $\pm$ 0.18a***	1.67 $\pm$ 0.04b	2.14 $\pm$ 0.07c	2.10 $\pm$ 0.09ac	0.14 $\pm$ 0.05a***	0.27 $\pm$ 0.16ac***	0.49 $\pm$ 0.02b***	0.34 $\pm$ 0.06c***
CHOL	227.33 $\pm$ 12.64a***	232.33 $\pm$ 3.98a***	267 $\pm$ 12.93b***	268 $\pm$ 9.76b***	155 $\pm$ 3.52a**	149.33 $\pm$ 11.22a**	221.67 $\pm$ 58.7b**	158.00 $\pm$ 2.61a**
GGT	11.6 $\pm$ 0.49a***	10.17 $\pm$ 0.28b***	11.70 $\pm$ 0.63a***	12.37 $\pm$ 0.64a***	13.30 $\pm$ 0.83ns	14.40 $\pm$ 1.24ns	14.60 $\pm$ 0.9ns	13.77 $\pm$ 0.46ns
HDL D	139.65 $\pm$ 8.65a***	123.8 $\pm$ 7.43b***	152.67 $\pm$ 6.68c***	146.63 $\pm$ 4.43ac***	95.97 $\pm$ 3.64a***	107.00 $\pm$ 16.16a***	123.70 $\pm$ 8.95b***	105.57 $\pm$ 2.80a***
LDL D	37.27 $\pm$ 2.52a***	56.9 $\pm$ 3.51b***	51.77 $\pm$ 5.52b***	50.73 $\pm$ 6.62b***	40.47 $\pm$ 2.85a***	26.07 $\pm$ 1.20b***	24.67 $\pm$ 0.86b***	37.47 $\pm$ 0.39c***
LIPASE	7.57 $\pm$ 0.56a***	11.87 $\pm$ 1.78b***	14.43 $\pm$ 1.99b***	13.50 $\pm$ 1.63b***	36.13 $\pm$ 11.77a*	18.83 $\pm$ 1.88b*	28.47 $\pm$ 6.35ab*	28.23 $\pm$ 9.18ab*
TG	61 $\pm$ 12.44a***	93.87 $\pm$ 19.71b***	51.9 $\pm$ 12.17a***	40.37 $\pm$ 1.65a***	50.00 $\pm$ 10a***	52.07 $\pm$ 1.44a***	49.97 $\pm$ 1.88a***	59.80 $\pm$ 5.57b***
TP	2.43 $\pm$ 0.21ab*	2.41 $\pm$ 0.08a*	2.64 $\pm$ 0.1b*	2.59 $\pm$ 0.1ab*	3.31 $\pm$ 0.21ns	3.36 $\pm$ 0.19ns	3.12 $\pm$ 0.10ns	3.11 $\pm$ 0.43ns
BILE ACID	32.56 $\pm$ 1.2a***	24.29 $\pm$ 9.03b***	19.07 $\pm$ 4.09b***	16.74 $\pm$ 1.84b***	5.33 $\pm$ 1.56a***	7.59 $\pm$ 0.92a***	5.42 $\pm$ 1.56a***	17.21 $\pm$ 11.19b***
LDH	3317.8 $\pm$ 165.11a***	2806.57 $\pm$ 231.04b***	3068.23 $\pm$ 58.23a***	2877.20 $\pm$ 128.85b***	4617.30 $\pm$ 175.48a***	5526.07 $\pm$ 1059.29a***	4918.20 $\pm$ 195.22a***	2144.90 $\pm$ 1535.58b***
AMY	1157.5 $\pm$ 86.23a***	1074.73 $\pm$ 10.1a***	1059.53 $\pm$ 80.26a***	905.23 $\pm$ 33.96b***	923.13 $\pm$ 12.01ns	1029.27 $\pm$ 229.92ns	646.27 $\pm$ 22.86ns	1477.74 $\pm$ 1085.90ns

Abbreviations: DOH – day on hatch; ALAT – alanine aminotransferase; ASAT – aspartate aminotransferase; BIL D – direct (serum) bilirubin; BIL T – total (serum) bilirubin; CHOL – cholesterol; GGT – gamma-glutamyl transpeptidase; HDL D – direct (serum) high-density lipoprotein; LDL D – direct (serum) low-density lipoprotein; LIPASE – lipase; TG – triglycerides; TP – total protein; BILE ACID – bile acids; LDH – lactate dehydrogenase; AMY – amylase.

Table 6

Summary of the results of one-way ANOVA analysis of variance for MDA [μ Mol/ml], Albumin [mg] and the MDA/Albumin ratio for the yolk sac 24 h (18th day of incubation) after *in ovo* administration of multi strain probiotic and/or Zn-Gly chelate.

Yolk sac - 18 DOI				
	Group			
	I	II	III	IV
MDA	1.1 $\pm$ 0.09a*	0.77 $\pm$ 0.08b*	0.84 $\pm$ 0.07ab*	0.77 $\pm$ 0.13b*
Albumin	592.63 $\pm$ 148.63	413.03 $\pm$ 12.47	425.29 $\pm$ 14.93	425.96 $\pm$ 81.19
MDA/Albumin	0.00204 $\pm$ 0.00077**	0.00186 $\pm$ 0.00021**	0.00198 $\pm$ 0.00019**	0.00191 $\pm$ 0.00059**

* $p > 0.05$;

** $p > 0.001$; DOI – day of incubation.

hatch, no statistically significant differences were observed in the $\sum$ PUFA n6/n3 ratio between groups. AI and TI values at DOH were statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in groups I and II than in groups III and IV. At 7 days post-hatch, the AI and TI values were statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in the control group (I) than in the supplemented groups. On the day of hatching (DOH), the hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic index (h/H) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in groups III and IV than in groups I and II, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in group III than in the control group (I) and group IV (see Table 2).

3.3. Fatty acid analysis and calculation of health lipid indices in liver samples

Statistically significant differences were observed in the content of fatty acids in liver samples between the experimental groups, with the exceptions of tetradecanoic acid (C 14:0), alpha linolenic acid (α C 18:3 n-3), and the sum of polyunsaturated fatty acids ($\sum$ n-3 PUFAs) on both sampling days (DOH and 7 days post-hatch) as well as octadecanoic acid (C 18:0) at DOH. The content of butanoic acid (C 4:0) at DOH was

statistically significantly higher in group III than in groups II and IV. At 7 days post-hatch, the level of C 4:0 was statistically significantly higher in the control group (I) than in group III, but there were no statistically significant differences in its level between group III and the other supplemented groups. At DOH, the level of hexadecanoic acid (C 16:0) was statistically significantly higher in group II than in groups III and IV. Similarly, at 7 days post-hatch, the level of hexadecanoic acid was statistically significantly higher in group II than in groups IV and I (control). At DOH, no statistically significant differences were observed in the level of C 16:1 n9 between the control group and the supplemented groups. The level of C 16:1 n9 in the liver at DOH was statistically significantly higher in group II than in group III, while its level at 7 days post-hatch was statistically significantly higher in group III than in groups I and IV. Compared to the control group (I), the level of oleic acid (C 18:1 n-9 *cis*) at DOH was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in group III, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group IV than in group II. No statistically significant differences were observed in the level of oleic acid in the other groups.

At DOH, the levels of elaidic acid (C 18:1 n-9 *trans*) in groups III and IV were statistically significantly higher than in group II. At 7 days post-hatch, values for elaidic acid were statistically significantly higher ($p \leq$

0.05) in groups III and IV than in the control group (I). The level of linoleic acid (C 18:2 n-6) at DOH was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group III than in groups I and II, but no statistically significant difference was observed between groups III and IV. At 7 days post-hatch, the levels of linoleic acid (C 18:2 n-6) in groups III and IV were statistically significantly higher than in group II. At DOH, the sum of saturated fatty acids ($\sum$ SFA) in the liver in groups III and IV was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) than in group II, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher in group II than in groups I and III. No statistically significant differences were observed in the remaining groups.

At DOH, the sums of monounsaturated, polyunsaturated and unsaturated fatty acids ($\sum$ MUFA, $\sum$ PUFA and $\sum$ UFA) were statistically significantly higher in groups I and IV than in group III; in group III compared to the remaining groups; and in groups I and IV versus group II, respectively. At 7 days post-hatch, the total MUFA level was statistically significantly higher in group III than in groups I and II. In addition, the $\sum$ PUFA and $\sum$ UFA values were statistically significantly higher in groups III and IV than in group II. Both at DOH and at 7 days post-hatch, the ratio of saturated fatty acids to unsaturated fatty acids ($\sum$ SFA/ $\sum$ UFA) was statistically significantly lower in group III than in group II. On both sampling days, the sum of n-6 PUFAs was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in group II than in groups III and IV. At DOH, the atherogenic index (AI) and thrombogenic index (TI) were statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II than in groups III and IV. At 7 days post-hatch, the AI and TI values in group II were statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II compared to groups I and IV and compared to group III, respectively. At DOH, the hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic (h/H) and $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA ratios were statistically significantly lower in group II than in groups III and IV. At 7 days post-hatch, the hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic (h/H) ratio in the control group (I) was statistically significantly higher than in groups II and IV. Similarly, the $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA ratio in the control group (I) at 7 days post-hatch was statistically significantly higher than in group II but did not differ statistically significantly from the other experimental groups. The saturation index (S/P) at DOH was statistically significantly higher in group II than in groups III and IV. At 7 days post-hatch, the saturation index (S/P) was statistically significantly higher in group II than in group III. No statistically significant differences were observed in the remaining groups. The $\sum$ PUFA n6/n3 ratio at DOH was statistically significantly higher in groups III and IV than in group II, while at 7 days post-hatch it was statistically significantly higher in group III than in groups II and IV (see Table 3).

3.4. Fatty acid analysis and calculation of health lipid indices in small intestine samples

Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were observed in the content of fatty acids in the intestinal samples, except for tetradecanoic acid (C 14:0) and octadecanoic acid (C 18:0) at DOH and linolenic acid (α C 18:3 n-3) and the sum of n-3 PUFAs on both days of the study. At DOH, the level of C 4:0 was statistically significantly higher in intestinal samples from group IV than in group II. No statistically significant differences in C 4:0 content were observed in the remaining groups. At 7 days post-hatch, the C 4:0 content was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II than in groups I and III. The level of this fatty acid in group III was statistically significantly lower than in the other groups. At DOH, the content of hexadecanoic acid (C 16:0) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group IV than in groups I and II, while at 7 days post-hatch, its content in groups I and II was statistically significantly higher than in group III. No statistically significant differences were observed in the remaining experimental groups.

The content of C 16:1 n9 in the small intestine samples at DOH was statistically significantly higher in groups III and IV than in groups I and II, while its content at 7 days post-hatch was statistically significantly

lower in groups II and III than in the control group (I). No statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were observed in the content of C 16:1 n9 at 7 days post-hatch between groups III and IV or between the control group (I) and group IV. At DOH, the content of C 18:1 n-9 *cis* acid was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group IV than in the control group (I). At 7 days post-hatch, its content was statistically significantly higher in the control group (I) than in group II and in group IV compared to group II. Analysis of the content of C 18:1 n-9 *trans* at DOH showed that it was statistically significantly higher in groups III and IV than in the control group (I). At 7 days post-hatch, C 18:1 n-9 *trans* content was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group IV than in group III. At DOH, the content of linoleic acid (C 18:2 n-6) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in the control group and group II than in group IV. Its content was also statistically significantly higher in group II than in group III. At 7 days post-hatch, the content of this acid was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group III than in the other groups. The sum of saturated fatty acids ($\sum$ SFA) at DOH was statistically significantly higher in group IV than in group II, while at 7 days post-hatch, the level in group II was statistically significantly higher than in group III, but did not differ statistically significantly from the remaining groups (I and IV). At DOH, the sum of monounsaturated fatty acids ($\sum$ MUFA) was statistically significantly higher in groups III and IV than in the control group (I), whereas at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher in the control group (I) and in group IV than in group II. At DOH, $\sum$ PUFA was statistically significantly higher in group II than in groups III and IV, whereas at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher in group III than in the control group (I) and group IV. At DOH, the sum of unsaturated fatty acids ($\sum$ UFA) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II than in the control group (I), while its content in groups III and IV did not differ statistically significantly ($p \leq 0.05$) from groups I and II. At 7 days post-hatch, $\sum$ UFA in group III was statistically significantly higher than in group II but did not differ statistically significantly from the other groups. At DOH, the $\sum$ SFA/ $\sum$ UFA ratio in group IV was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in group II, while at 7 days post-hatch it was statistically significantly higher in group II than in group III. The content of $\sum$ PUFA n-6 and the $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA ratio at DOH were statistically significantly higher in group II than in groups III and IV. At 7 days post-hatch, the content of $\sum$ PUFA n-6 was statistically significantly higher in group III than in the other groups, while the $\sum$ PUFA/ $\sum$ SFA ratio in group III was statistically significantly higher than in group II but did not differ statistically significantly from the other groups. At DOH, the saturation index (S/P) was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group IV than in group II, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II than in group III. At DOH, the $\sum$ PUFA n6/n3 ratio was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) in group II than in group IV, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher in group III than in the other groups.

The atherogenic index (AI) at DOH was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in group II than in group IV, and conversely, the thrombogenic index (TI) in group IV was statistically significantly higher ($p \leq 0.05$) than in group II. At 7 days post-hatch, the AI and TI values were both statistically significantly higher in group II than in group III. The h/H ratio at DOH was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in group IV than in the remaining groups, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in group II than in groups III and IV (see Table 4).

3.5. Levels of selected biochemical parameters in the serum

The analysis of biochemical parameters did not show statistically significant differences between groups in the concentrations of alanine aminotransferase (ALAT) or direct bilirubin (BIL D) at DOH or in the levels of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), total protein (TP), or amylase (AMY) at 7 days post-hatch. At 7 days post-hatch, the ALAT concentration was statistically significantly lower ($p \leq 0.05$) in groups II

and III than in the control group (I). The direct serum bilirubin (BIL D) concentration was statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) in groups II, III and IV than in the control group (I), and its concentration in group IV was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) than in groups II and III. At DOH, the GGT concentration in group II was statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) than in the other groups. The total protein (TP) concentration in group II was also statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) than in group III at DOH. The amylase (AMY) concentration in group IV at DOH was statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) than in the other experimental groups. The total serum bilirubin (BIL T) concentration at DOH was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in group III than in the control group (I) and group II, in which it was also statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) than in the other groups. At 7 days post-hatch, the total serum bilirubin (BIL T) concentration in group III was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) than in the other groups. The analysis of the cholesterol (CHOL) concentration at DOH showed statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) values in groups III and IV than in the control group (I) and group II. At 7 days post-hatch, the cholesterol (CHOL) concentration in group III was statistically significantly higher ($p \leq 0.001$) than in the other groups. The concentration of direct serum high-density lipoprotein (HDL D) in group III at DOH was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) than in the control group (I) and group II, but did not differ statistically significantly from group IV. Similarly, at 7 days post-hatch, the HDL D concentration was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in group III than in the other groups. At DOH, concentrations of direct serum low-density lipoprotein (LDL D) and lipase were statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in the supplemented groups than in the control group (I). However, at 7 days post-hatch, the LDL D concentration in all supplemented groups was statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) than in the control group (I), while in group IV it was statistically significantly higher than in groups II and III. The lipase concentration ($p \leq 0.05$) at 7 days post-hatch was statistically significantly higher in the control group than in group II, while in the remaining supplemented groups, it did not differ statistically significantly from the control group (I). The concentration of triglycerides (TG) at DOH was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in group II than in the other groups, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in group IV than in the other groups. In the remaining groups, the TG concentration did not differ statistically significantly on either sampling day. The concentration of bile acids at DOH was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in the control group (I) than in the other groups (supplemented), while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in group IV than in the other groups. Their concentrations did not differ statistically significantly in the remaining groups on either sampling day. At DOH, the concentration of lactate dehydrogenase (LDH) was statistically significantly higher ($p \leq 0.0001$) in the control group (I) and in group III than in groups II and IV, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly lower ($p \leq 0.0001$) in group IV than in the remaining groups (see Table 5).

3.6. Analysis of variance of MDA, albumin, and the MDA/albumin ratio in the yolk sac 24 h after in ovo supplementation

At 24 h after in ovo supplementation, the mean malondialdehyde (MDA) level in the yolk sac was statistically significantly lower ($p > 0.05$) in groups II and IV than in the control group (I). No statistically significant differences in the albumin content in the yolk sac were observed between groups (see Table 6).

3.7. Analysis of the mean MDA level, the albumin concentration, and the MDA/albumin ratio in the serum, small intestine, liver, pectoral muscle and thigh muscle on the day of hatching (DOH) and at 7 days post-hatch

At DOH, the mean level of MDA in the serum of the chicks was

statistically significantly higher in the control group (I) than in the supplemented groups. At 7 days post-hatch, the mean serum level of MDA was statistically significantly higher in group IV than in group III and the control group (I). At DOH, no statistically significant differences were observed between groups in the mean MDA level in the pectoral muscle. No statistically significant differences between groups were observed on either sampling day in the mean MDA level in the small intestine. At 7 days post-hatch, no statistically significant differences between groups were observed in the mean MDA level in the thigh muscle or the liver. At DOH, the mean MDA level in the thigh muscle of the chickens was statistically significantly higher in group III than in groups I and II. The mean MDA level in the pectoral muscle at 7 days post-hatch was statistically significantly lower in group IV than in the control group (I). At DOH, the mean MDA level in the yolk sac was statistically significantly higher in group III than in the control group (I), while no statistically significant differences were observed in the remaining groups (Fig. 2).

At DOH, no statistically significant differences were observed between groups in the mean concentration of albumin in the small intestine, thigh muscle, liver, or yolk sac. The mean serum albumin concentration at DOH was statistically significantly lower in group IV than in the other groups and in groups I and III compared to group II. The mean concentration of albumin in the pectoral muscle at DOH was statistically significantly lower in groups II and III than in groups I and IV. At 7 days post-hatch, no statistically significant differences between groups were observed in the mean albumin concentration in any of the tissues tested (Fig. 3).

No statistically significant differences in the mean MDA/albumin ratio in the small intestine were observed between groups at either DOH or 7 days post-hatch. At 7 days post-hatch, no statistically significant differences in this ratio were observed in liver samples between groups, whereas at DOH, it was statistically significantly higher in the liver of chickens in group IV than in the control group (I). At DOH, the mean MDA/albumin ratio in the thigh muscle was statistically significantly higher in group III than in groups I and II, while at 7 days post-hatch, the mean ratio in the thigh muscle was statistically significantly higher in group IV than in group II. At DOH, the mean MDA/albumin ratio in the serum was statistically significantly higher in the control group (I) than in the other groups (supplemented), whereas at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher in group IV than in the control group (I) and group III. The mean MDA/albumin ratio in the pectoral muscle at DOH was statistically significantly higher in groups II and III than in groups I and IV, while at 7 days post-hatch, it was statistically significantly higher in the control group (I) than in group IV. The mean MDA/albumin ratios in the yolk sac at DOH were statistically significantly higher in groups III and IV than in groups I and II (Fig. 4).

4. Discussion

Chicken is regarded as one of the healthiest meats due to its nutrient composition. It contains a beneficial mixture of unsaturated fatty acids, predominantly PUFAs, and has low cholesterol content, which reduces the risk of cardiovascular disease, including ischaemic heart disease (Connolly and Campbell, 2023). Factors significantly influencing the quality of chicken meat and its content of FAs include genetic determinants and the birds' diet (Fletcher, 2002). Particular importance is ascribed to numerous feed supplements, including the Zn and probiotic supplements tested in the present study. Analysis of the results of the study indicate that the PUFA concentration decreased in the breast muscle of birds in the group receiving the multi-strain probiotic in ovo, while it increased in the thigh muscle in the same group of birds. Similar observations were reported by Hossain et al. (2012), who showed a decrease in the PUFA concentration in the breast muscle of broiler chickens fed a diet enriched with a herb extract (*Alisma canaliculatum*) in combination with various strains of probiotic microorganisms. Contrasting data were presented by Salma et al. (2007), who showed an

increase in the PUFA concentration in chickens fed a diet containing 0.04 % *Rhodobacter capsulatus* for six weeks. Zhou et al. (2009) and Ghasemi et al. (2016), on the other hand, did not confirm a stimulatory effect of feed supplementation with prebiotics and synbiotics with respect to the PUFA concentration in the breast muscle of 42-day chickens. These conflicting results may be linked to the different microorganisms used in the construction of the pro-, pre- and synbiotics or to different metabolic pathways of lipids and the type of fatty acids synthesized. It seems that the multi-strain probiotic administered *in ovo* in the present study may stimulate various lipid metabolic pathways, e. g. it may stimulate the conversion of PUFAs to docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), prostaglandins, and others, explaining the differences in PUFA concentrations (Wu et al., 2022).

Chemical components of chicken muscle, including fatty acids – MUFAs, PUFAs and SFAs, are used to assess the quality and nutritional value of meat, and they determine its sensory attributes, such as its flavour and smell (Wood et al., 2004). Chicken meat has been shown to contain mainly palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1n9c) and the PUFA linoleic acid (C18:2n6c) (Amorim et al., 2016). PUFAs are susceptible to peroxidation, which generates volatile and non-volatile compounds determining the smell and taste of meat. A high concentration of C18:2n6c and peroxidation of this acid are mainly responsible for negative sensory perceptions (Lee et al., 2019). The tests performed at 7 days post-hatch in the present study showed a higher concentration of this acid in the thigh muscle in all experimental groups in comparison with the control. In the breast muscle, the C18:2n6c concentration was higher only in the group of birds receiving Zn-Gly chelate. It is possible that fat metabolism pathways are modified over the course of development of chicks, presumably due to their activation by the supplements administered *in ovo*, especially Zn glycine chelate. This leads to an increase in PUFAs, including linoleic acid, and adversely affects the flavour of meat. In addition, chicken meat, especially the thigh muscle, due to its higher content of PUFAs, is more susceptible to peroxidation processes, which limits the possibility of long-term storage.

Analysis of the FA content in the poultry tissues should take into account the fact that chicken fat has a high concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially n-3 PUFAs (Valsta et al., 2005; D'Alessandro et al., 2012), which have a beneficial effect on the cardiovascular system, immune system, metabolic processes, and the eye, and even enhance the consumer's mental health potential. Therefore, higher content of these acids in meat is a favourable phenomenon in terms of health. In our experiment, no changes in the concentration of Σ n-3 PUFAs in the liver or small intestinal tissue were shown at DOH or at 7 days of age. However, despite the low content of n-3 PUFAs shown in the breast muscle, it did not adversely affect the health of the birds (Ciszewski et al., 2023a). While high concentrations of Σ n-3 PUFAs may be shown in the case of zinc deficiencies (Eder and Kirchgessner, 1994), the low concentration of Σ n-3 PUFAs shown in the present study at DOH may indicate that Zn supplementation is effective. The increase in Σ n-3 PUFAs observed at 7 days post-hatch is not indicative of mineral deficiencies, but rather of a link between n-3 PUFAs and the intestinal microflora and supplemented zinc. The gastrointestinal microbiota of poultry modified by a multi-strain probiotic administered *in ovo* may influence the metabolism and absorption of n-3 PUFAs, which in the present study led to the increase in the concentration of these acids in the muscle tissue. In addition, n-3 PUFAs ingested by birds in a standard diet can modify the numbers and diversity of the intestinal microbiome and influence the rate of metabolic changes, including the activity of desaturases in the metabolic pathway of n-3 and n-6 PUFAs. Interactions between n-3 PUFAs, the intestinal microflora (Jayapala and Lim, 2023), and Zn, which influence immune functions, help to maintain intestinal integrity and the homeostasis of the microbial environment of the gut. Independently of this effect, these interactions can stimulate the immune system of poultry (Ciszewski et al., 2023a, A. b).

The results of the present study indicate that the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate administered *in ovo* do not cause changes in

the HDL cholesterol level. Moreover, the HDL concentration decreased in the group of birds receiving the multi-strain probiotic alone. In contrast, at 7 days post-hatch there was a statistically significant increase in the HDL cholesterol level in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. In contrast, the level of LDL cholesterol at DOH was higher in all experimental groups than in the control, but at 7 days it was lower in all experimental groups. The low HDL levels shown may be linked to the low concentrations of linoleic and linolenic acid in the tissues. They may also be associated with the concentration of myristic acid, a SFA which can reduce the HDL concentration by modifying non-specific binding of HDL cholesterol to liver cells, as confirmed by Noto et al. in a study of liver cells in an *in vitro* model (Rioux et al., 2011; Noto et al., 2016). In the present study, the concentration of myristic acid was higher in the experimental groups than in the control only in the breast muscle at 7 days post-hatch. At DOH and in the remaining tissues on both test days, its concentration did not change or was slightly lower than in the control. These results demonstrate that although the supplements administered *in ovo* do not significantly influence PUFA concentrations in the initial post-hatch period, they also do not affect the concentrations of certain saturated fatty acids, which counteracts the decrease in the concentration of 'good' HDL cholesterol. Analysis of the LDL and HDL cholesterol levels in the chicks at 7 days suggests that the *in ovo* route of supplementation used in the experiment may also induce long-term effects in the form of an increased concentration of HDL cholesterol, especially in birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate.

The predominant saturated fatty acids (SFAs) present in chicken meat are palmitic and stearic acid (Amorim et al., 2016), which at high concentrations in tissues may adversely affect the health-promoting quality of meat. The study showed that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic caused a statistically significant increase in the SFA concentration in the breast muscle and liver at DOH, while in the small intestinal tissue a similar increase was noted following administration of Zn-Gly chelate alone or in combination with the multi-strain probiotic. At 7 days of age, an increase in the concentration of SFAs, mainly stearic and palmitic acid, was shown in the breast muscle and liver of the birds in the group receiving the multi-strain probiotic *in ovo*. In addition, the myristic acid concentration increased in the breast muscle, which was particularly evident at 7 days post-hatch in the groups receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*. The results of the study contrast with those published by Tang et al. (2021), who showed that supplementation with *B. subtilis* in broilers significantly decreases the concentrations of C14:0, C16:0 and C20:0 in the breast muscle and of C16:0 and total SFAs in the thigh muscle, which gives the meat valuable health benefits. The multi-strain probiotic administered *in ovo* increased total SFAs in the breast muscle, which undergoes intensive growth in chicken, in contrast to the thigh muscle, in which the SFA concentration remained unchanged or was lower than in the control, which also indicates benefits for human health. The literature indicates that the use of probiotics as diet supplements also reduces the SFA concentration in the meat of other animals, such as pork (Ross et al., 2012), and goat (Paengkoum et al., 2011). This phenomenon may be explained by the overall decrease in the lipid concentration in the plasma or the reduced concentration of mRNA for stearoyl-CoA desaturase in the liver (SCD, $\Delta 9$ -desaturase), which catalyses the conversion of saturated fatty acids (Jung et al., 2006; Kucharski and Kaczor, 2014).

Following *in ovo* administration of the supplements, the Σ PUFA/ Σ SFA ratio in the breast muscle at DOH did not differ significantly from the control in any of the experimental groups, ranging from 0.46 to 0.56. In the case of the thigh muscle, this ratio was lower in the experimental groups (0.53–0.67) than in the control – 0.81. At 7 days of age, the ratio in the breast muscle was below 0.45, particularly in the groups receiving the probiotic *in ovo*, for which it was 0.3–0.41. The reverse was noted during the same period in the thigh muscles, in which the ratio was higher in the experimental groups than in the control. It is possible that

the thigh muscle of chickens has higher anticholesterolaemic potential than the breast muscle and can be recommended in the diet of people at risk of fatty diseases.

Monounsaturated fatty acids (MUFAs) have been shown to positively influence the blood lipid profile (Kien et al., 2014), reduce the LDL cholesterol level, and regulate the level of triacylglycerols, thereby lowering the risk of heart disease and stroke, reducing adipose tissue, reducing joint pain and stiffness, and improving fertility. After *in ovo* supplementation with the multi-strain probiotic, a decrease in the MUFA concentration was observed at DOH in the breast and thigh muscles, as well as in the soft organs after combined administration of the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. Similarly, 7 days after hatching, a decrease in the MUFA concentration was observed in the breast muscles and small intestine tissue in the groups receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. At the same time, in the same groups there was a decrease in the concentration of oleic acid at DOH in the breast muscle and liver but no differences in its concentration in the thigh muscle. At 7 days, there was a decrease in the concentration of oleic acid in the breast muscle, thigh muscle, and small intestinal tissue, particularly in the groups receiving the multi-strain probiotic. Similar observations were made by Kalavathy et al. (2006), who showed a reduced concentration of oleic acid in chickens fed a diet supplemented with a probiotic containing *Lactobacillus* cultures, which indicates that this type of supplementation reduces the synthesis or absorption of oleic acid. Contrasting results were presented by Yang et al. (2010), who found no effect of a feed supplement containing *C. butyricum* on the MUFA concentration in the breast muscle of chickens, and by Zhou et al. (2009) and Tang et al. (2021), who showed an increase in the MUFA concentration in the breast muscle of broiler chickens fed a diet enriched with a chito-oligosaccharide prebiotic or a probiotic containing *Bacillus subtilis*. This phenomenon may be due to insufficient activity of desaturases, responsible for conversion of SFAs into MUFAs, or to insufficient levels of intramuscular fat (Sirri et al., 2011). This question requires in-depth proteomic studies of enzymatic activity in these tissues.

The P/S, n-6/n-3 PUFA and h/H ratios and other atherogenic indices of thrombogenicity are widely used to assess the nutritional value of fat. The P/S ratio is important for human health, because it influences the occurrence of cardiovascular diseases (Wood et al., 2004). It is recommended that the ratio of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) to SFAs (P/S) in tissues should be at least 0.4 (Muchenje et al., 2009). In our experiment, *in ovo* application of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate resulted in an increase in the P/S ratio in the breast muscle at DOH and at 7 days post-hatch. In the thigh muscle, the ratio was increased only at DOH, while at 7 days post-hatch it was lower in the experimental groups than in the control, which was directly linked to the decrease in the PUFA concentration. The favourable P/S ratio above 0.4 in the breast muscle indicates that this type of *in ovo* supplementation is not only conducive to a favourable ratio of PUFAs to SFAs, but also promotes the health-promoting properties of chicken meat.

The AI index illustrates the relationship between the sum of the main SFAs and the main classes of UFAs. SFAs have been shown to exert a pro-atherogenic effect, promoting the adhesion of lipids to cells of the blood vessels, whereas UFAs have an anti-atherosclerotic effect (Woloszyn et al., 2020). The TI index shows the relationship between pro-thrombogenic (saturated) and antithrombogenic fatty acids. High AI and TI values in consumed meat can stimulate platelet aggregation and promote clot formation in blood vessels, resulting in coronary artery disease (Ghaeni et al., 2013). Low AI and TI values in meat are beneficial for human health, counteracting atherosclerosis and protecting against coronary artery disease. In the present study, the TI index in the thigh muscle was higher in the groups receiving Zn-Gly chelate *in ovo*. The AI value was also higher in the thigh muscle in the groups receiving Zn-Gly chelate, as well as in the breast muscle in the group receiving zinc glycine chelate alone. The test conducted 7 days after hatching showed higher AI and TI values in the breast muscle in the groups receiving the multi-strain probiotic. In the thigh muscle, the values of these

parameters at this time were statistically significantly lower in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. It is worth noting that the AI value was below 1.0 on both test days, while the TI index was above 0.5, ranging from 0.88 to 1.83 in the experimental groups, which was several times as high as the recommended values for these groups of muscles. Despite the non-physiological TI values, which might suggest that the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate have a prothrombotic effect, thus contributing to cardiovascular diseases, including coronary artery disease, it should be stressed that this index exceeded 0.5 in the control group as well, even reaching a level of 1.27 in the thigh muscle at 7 days post-hatch. The results might suggest that meat from chickens fed diets with the supplements tested in this study may have poor dietary value. However, Winiarska-Mieczan et al. (2023), demonstrate that assessment of the dietary value of meat should be treated comprehensively, so a single parameter should not affect the overall assessment. Previously published research by Winiarska-Mieczan et al. (2021), showed that following the use of Zn chelate in chickens in the amount of 50 mg kg⁻¹ of feed, AI and TI values are very low and consistent with the values recommended for meat, whereas the h/H index remains high. The study showed that Zn glycine chelate can be used in amounts meeting 50 % of the Zn requirement and still ensure high dietary value of meat and high antioxidant stability (Winiarska-Mieczan et al., 2021). However, the study cited was carried out in the period from hatching to slaughter and did not include the period of embryonic development, when intensive metabolism of fats takes place. Because the present study was conducted in the initial period of development, it is unsurprising that analogous results may differ in the final period of rearing.

The saturation index (S/P) is a commonly used criterion for assessing the dietary value of fat. The value of this index is mainly influenced by the presence of PUFAs and MUFAs. The lower the saturation index, the higher the health-promoting quality of the meat (FAO, 2010). The low S/P values in the group receiving Zn-Gly chelate *in ovo* and the group receiving Zn-Gly chelate together with the multi-strain probiotic indicate higher health value of the tissues obtained from these birds. In contrast to the S/P index, the value for the ratio of hypocholesterolaemic fatty acids to hypercholesterolaemic fatty acids (h/H) should be as high as possible (Winiarska-Mieczan et al., 2023), because it determines the effect of fatty acids on cholesterol metabolism, an important parameter for assessment of human health. *In ovo* administration of the supplements tested in the present study had no effect on the h/H value at DOH or reduced it in the breast and thigh muscle of the birds in the experimental groups. Only at 7 days post-hatch were high h/H values noted in the thigh muscle in the groups that received Zn-Gly chelate *in ovo*. It should be stressed that at DOH the serum concentration of cholesterol in the birds in all experimental groups was higher than in the control, while at 7 days it was higher only in the group of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*. It is therefore likely that the *in ovo* supplementation used in our study does not significantly affect metabolism of cholesterol or reduce its total content. Similarly, the use of the multi-strain probiotic EM Bokashi in other animal species, such as pigs during the fattening period, has not been shown to affect the h/H ratio (Goluch et al. 2023). On the other hand, literature data show that supplementation with probiotics such as *L. acidophilus* in broilers during the period from hatching to slaughter improves the health parameters of meat, including the PUFA/SFA, MUFA/SFA, and UFA/SFA ratios, the saturation index, AI, TI, DFA, HFA and h/H. This is probably due to the effect of the probiotic on the expression of the stearyl-CoA desaturase gene (SCD-1) (Dev et al., 2021). The contrasting results of our experiment are due to administration of the supplements prior to hatching, so the effect of the supplements on fat metabolism may have involved the use of different metabolic pathways to those described in the case of post-hatch diet supplementation.

Analysis of the results of the study should also take into consideration short-chain fatty acids (SCFA), including butyric acid. These organic compounds are important sources of energy for epithelial cells.

They ensure normal functioning of the gastrointestinal tract, reduce intestinal pH, prevent the growth of pathogens, enhance mineral absorption, and additionally can inhibit the effects of pro-inflammatory cytokines (Liu et al., 2021). Butyric acid has been shown to contribute to maintenance of glucose homeostasis in the blood and to stimulate glycogen metabolism, thereby improving muscle function and performance (Zhang et al., 2019). Ahmed et al. (2018) showed that supplementation with prebiotics promotes the growth of lactic acid bacteria (LAB), which increases the concentration of SCFAs in the body. At DOH the concentration of butyric acid was statistically significantly higher in the small intestinal tissue of birds in the group receiving Zn-Gly and in the liver of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. At 7 days post-hatch, its concentration was higher in the thigh muscle and small intestine in the group receiving the multi-strain probiotic. It is likely that *in ovo* administration of the supplements affects the organism during the growth stage, stimulating its development by stabilizing the gastrointestinal microbiota and through synthesis of SCFAs by the microbes forming the microbiome. Great importance is currently ascribed to the interaction between the intestinal microbiome and muscle tissue. In this interaction, called the brain-gut-muscle axis, transmission of cellular signals is mediated by intestinal SCFAs produced by the bacteria of the microbiome. In this case, SCFAs can also influence muscle metabolism and functioning (Li et al., 2018; Canfora et al., 2019). In the present study, higher concentrations of butyric acid were shown in the breast muscle tissue at DOH and at 7 days post-hatch in the chicks that received the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*. Its highest concentrations were shown in the group of chicks that received only the multi-strain probiotic. These results confirm the previous assumptions that probiotic bacteria affect the intestinal microbiome of the developing embryo and then the chick. These interactions result in a modification of the composition of the microbiome conducive to the production of SCFAs. Butyric acid supplied to the breast muscles in the bloodstream promotes their growth, development and functionality. Similar observations have been made by Chang et al. (2018) in research on mice, which showed that butyrate supplementation stimulates the production of oxidative fibres in the skeletal muscles and increases the content of myoglobin and troponin in the muscles, affecting their contractibility. Dai et al. (2018) showed that butyric acid stimulates the growth of intestinal muscle cells in humans by activating YAP (yes-associated protein), which is additionally involved in regeneration of smooth muscle cells in mammals (Feng et al., 2016), and neuromuscular junctions (Zhao et al., 2017a). Correct interpretation of these results requires additional proteomic and molecular analysis, especially of the breast muscle tissue.

Tissues of developing chicken embryos have high content of polyunsaturated fatty acids in the lipid fraction (Surai et al., 2016). Intensive metabolic processes taking place in rapidly developing chicken embryos and in the post-hatch period lead to the development of oxidative stress, resulting in ROS production. ROS cause lipid peroxidation, leading to changes in the composition, structure and properties of cell membranes and in the activity of enzymes associated with the membrane (Surai et al., 1999b, 2016). This can increase embryo mortality, lead to impairment of the growth of birds after hatching, and also adversely affect immune phenomena in birds. To prevent this type of damage, chicken embryos must be equipped with antioxidant protection (Surai et al., 2016). Our previous research (Ciszewski et al., 2023) showed that *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate increases total antioxidant capacity (T-AOC) and SOD and CAT activity, which is accompanied by the release of pro- and anti-inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ and IL-10. These findings are evidence of the stimulatory effects of these supplements on cellular and humoral immune mechanisms. The quantitative and qualitative changes in the fatty acids of tissues and organs induced by the supplements tested in the present study may be conducive to oxidation of polyunsaturated fatty acids, during which malondialdehyde (MDA), an indicator of the intensity of oxidation processes, is generated (Del Rio et al., 2005).

Analysis of the MDA concentration during the experiment showed that at DOH it was increased in the thigh muscle tissue in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo* and in the group receiving Zn-Gly chelate alone, as well as in the liver of the birds in the group receiving the multi-strain probiotic. It is worth noting that no increase in the concentration of PUFAs susceptible to peroxidation was shown in any of the tissues at this time. Previously published findings indicate that probiotics exert a protective effect on the body in the case of oxidative stress (Kullisaar et al., 2002). The increased MDA concentration shown in the tissues in the present study, especially in the muscles, may be associated with embryonic growth and development and overall muscle development in broilers under the influence of the probiotic. These processes are associated with modulation of genes regulating the proliferation and differentiation of progenitor muscle cells, an increase in the number of muscle fibres (Muyyarikkandy et al., 2023), and rearrangement of tissues, resulting in oxidation processes within the cell membranes. The increased MDA concentration in the yolk sac of the birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo* was most likely caused by metabolic activation induced by these supplements and the intensive development of cellular structures during this period. At 7 days post-hatch, on the other hand, no changes were noted in the MDA concentration in the tissues of the small intestine or in the liver (Fig. 1). In addition, the MDA concentration in the breast muscle tissue was lower at 7 days in all experimental groups of birds – those receiving the multi-strain probiotic and/or Zn-Gly chelate *in ovo*. The low MDA concentration therefore suggests that these supplements limit oxidative stress in the developing embryo and newly hatched chick and do not generate excessive ROS. These results are in agreement with previous research (Ciszewski et al., 2023b) showing that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and/or Zn-Gly chelate causes activation of antioxidant systems, which protect the bird and can be used to obtain healthy chicks and reduce their mortality in the pre- and post-hatch period.

It is worth noting that the MDA concentration in the serum and tissues was lower than in the control at 18 days of incubation, i.e. 24 h after *in ovo* administration of Zn-Gly chelate, and in the same group of birds at DOH. The results are in agreement with the findings of Xiao et al. (2024), who showed that *in ovo* administration of Zn-Gly to chicken embryos with or without lipopolysaccharide challenge does not cause changes in the MDA concentration in the liver or small intestine. Zinc administered *in ovo* is most likely not directly involved in antioxidant defence of the embryo, but indirectly takes part in regulation of zinc homeostasis and inhibition of the production of pro-inflammatory cytokines (Ciszewski et al., 2023b) protecting against the occurrence of a cytokine storm (Nakamura et al., 2019).

Some limitations of the current study should be noted. The effect of a multi-strain probiotic administered together with zinc glycine chelate during incubation of a chicken embryo on fat metabolism and oxidative stress has not previously been studied, so it was not possible to compare our results with the findings of other authors. Our knowledge of fat metabolism following the application of bioactive compounds *in ovo* is incomplete, and confirmation of some of the conclusions requires a wider scope of research, including proteomic analysis, which would help to elucidate how these preparations work at the level of cellular metabolism. The study covered only the first seven days after hatching; fatty acid concentrations and parameters of oxidative stress may differ significantly at the end of the production cycle. However, the results reveal a certain trend in regulation of fatty acid synthesis, which may persist up to the end of the production cycle and exert a beneficial effect on production parameters. Moreover, the chicks used in the study were of a single breeding line (Ross 308). Fatty acid composition, the MDA concentration in serum and tissues, and biochemical parameters may differ depending on the species of bird, breeding line, breed, and genetic properties of a given line and breed of poultry.

5. Conclusion

The results of the study indicate that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate on the 17th day of incubation of chicken embryos affects their fat metabolism and the quality of chicken meat. A multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate administered *in ovo* reduce the PUFA concentration at DOH in the breast and thigh muscle and in the intestinal tissue. Simultaneous administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo* increases the concentration of PUFAs in the thigh muscle, liver, and small intestinal tissue at 7 days of age. Moreover, the analysis of the results confirmed that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate can stimulate the synthesis of SFAs, mainly stearic, palmitic and myristic acids, improve the ratio of PUFAs to SFAs, and reduce the concentration of MUFAs, which contributes to muscle growth. The diet supplements used in the study, administered *in ovo*, unquestionably have a strong influence on fat metabolism, which translates to variable values for the parameters tested in the muscles, and indirectly to the atherogenic index (AI), thrombogenic index (TI), and hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic (h/H) fatty acid ratio. Moreover, the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate administered *in ovo* did not cause excessive MDA synthesis in the tissues, which suggests that these preparations reduce oxidative stress in the developing embryo and newly hatched chick. Further proteomic and molecular studies on the expression of proteins responsible for lipid metabolism, as well as analysis of the enzymatic profile of cells, will enable a better understanding of the mechanisms of the influence of *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate on fat metabolism and the development of muscle tissue in chickens at later stages of their development.

Funding

This research was funded by the University of Life Sciences in Lublin, Poland, project No SD/77/WET/2023.

Ethics approval and consent to participate

All procedures involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted. All procedures used during the research were approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval number 106/2022, 17 October 2022).

CRedit authorship contribution statement

Artur Ciszewski: Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Łukasz S. Jarosz:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition. **Zbigniew Grądzki:** Supervision. **Agnieszka Marek:** Writing – review & editing, Formal analysis. **Sebastian Kaczmarek:** Validation. **Małgorzata Kwiecień:** Validation, Methodology. **Anna Rysiak:** Visualization, Software.

Declaration of competing interest

The authors (Artur Ciszewski, Łukasz S. Jarosz, Zbigniew Grądzki, Agnieszka Marek, Sebastian Kaczmarek, Małgorzata Kwiecień, Anna Rysiak) declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.livsci.2024.105577](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577).

References

- Abd El-Hack, M.E., Alagawany, M., Amer, S.A., Arif, M., Wahdan, K.M.M., El-Kholi, M. S., 2018. Effect of dietary supplementation of organic zinc on laying performance, egg quality and some biochemical parameters of laying hens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 102 (2), e542–e549. <https://doi.org/10.1111/jpn.12793>.
- Ahmed, M.M.N., Ismail, Z.S.H., Abdel-Wareth, A.A.A., 2018. Application of prebiotics as feed additives in poultry nutrition-a review. *Egypt. Poult. Sci. J.* 38 (1), 207–222.
- Alizadeh, M., Bavananthasivam, J., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Alqazlan, N., Boodhoo, N., Doost, J.S., Sharif, S., 2021. *In ovo* and oral administration of probiotic *Lactobacilli* modulate cell- and antibody-mediated immune responses in newly hatched chicks. *Front. Immunol.* 12, 664387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664387>.
- Alizadeh, M., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Karimi, S.H., Bavananthasivam, J., Kulkarni, R.R., Sharif, S., 2020. Effects of *in ovo* inoculation of multi-strain *Lactobacilli* on cytokine gene expression and antibody-mediated immune responses in chickens. *Front. Vet. Sci.* 7, 105. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00105>.
- Alshamy, Z., Richardson, K.C., Harash, G., Hünigen, H., Röhe, I., Hafez, H.M., Plendl, J., Al Masri, S., 2019. Structure and age-dependent growth of the chicken liver together with liver fat quantification: a comparison between a dual-purpose and a broiler chicken line. *PLoS ONE* 14 (12), e0226903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226903>.
- Amorim, A., Rodrigues, S., Pereira, E., Teixeira, A., 2016. Physicochemical composition and sensory quality evaluation of capon and rooster meat. *Poult. Sci.* 95 (5), 1211–1219. <https://doi.org/10.3382/ps/pev448>.
- Anderson, J.W., Gilliland, S.E., 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 18 (1), 43–50. <https://doi.org/10.1080/07315724.1999.10718826>.
- Attia, Y.A., Al-Harthi, M.A., El-Shafey, A.S., Rehab, Y.A., Kim, W.K., 2017. Enhancing tolerance of broiler chickens to heat stress by supplementation with Vitamin E, Vitamin C and/or probiotics. *Ann. Anim. Sci.* 17 (4), 1155–1169. <https://doi.org/10.1515/aas-2017-0012>.
- Bhanja, S.K., Goel, A., Pandey, N., Mehra, M., Majumdar, S., Mandal, A.B., 2015. *In ovo* carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99 (1), 163–173. <https://doi.org/10.1111/jpn.12193>.
- Canfora, E.E., Meex, R.C.R., Venema, K., Blaak, E.E., 2019. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15 (5), 261–273. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0156-z>.
- Chang, S., Chen, X., Huang, Z., Chen, D., Yu, B., Chen, H., He, J., Luo, J., Zheng, P., Yu, J., Luo, Y., 2018. Dietary sodium butyrate supplementation promotes oxidative fiber formation in mice. *Anim. Biotechnol.* 29 (3), 212–215. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1358734>.
- Cheled-Shoval, S.L., Amit-Romach, E., Barbakov, M., Uni, Z., 2011. The effect of *in ovo* administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre- and posthatch periods in chickens. *Poult. Sci.* 90 (10), 2301–2310. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01488>.
- Ciszewski, A., Jarosz, Ł., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A., 2023a. Effect of combined *in ovo* administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* 102 (9), 102823. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>.
- Ciszewski, A., Jarosz, Ł.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiak, A., 2023b. Effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants* 12 (11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>.
- Connolly, G., Campbell, W.W., 2023. Poultry consumption and human cardiometabolic health-related outcomes: a narrative review. *Nutrients* 15 (16), 3550. <https://doi.org/10.3390/nu15163550>.
- Cunnane, S.C., 1988. Evidence that adverse effects of zinc deficiency on essential fatty acid composition in rats are independent of food intake. *Br. J. Nutr.* 59 (2), 273–278. <https://doi.org/10.1079/BJN19880034>.
- Dai, L.N., Yan, J.K., Xiao, Y.T., Wen, J., Zhang, T., Zhou, K.J., Wang, Y., Cai, W., 2018. Butyrate stimulates the growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of yes-associated protein. *J. Cell. Physiol.* 233 (4), 3119–3128. <https://doi.org/10.1002/jcp.26149>.
- D'Alessandro, A.G., Maiorano, G., Kowalszyn, B., Loiudice, P., Martemucci, G., 2012. How the nutritional value and consumer acceptability of suckling lambs meat is affected by the maternal feeding system. *Small Rumin. Res.* 106, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.001>.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15 (4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>.
- de Souza, M., Cicero, C.E., Menck-Costa, M.F., Justino, L., Gerez, J.R., Baptista, A.A.S., Bracarense, A.P.F.R.L., 2021. Histological evaluation of the intestine of broiler chickens: comparison of three sampling methods. *Semin. Ciênc. Agrar.* 42 (06), 3247–3258. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6p3247>.
- Dev, K., Begum, J., Biswas, A., Kannoujia, J., Mir, N.A., Sonowal, J., Kant, R., Narender, T., 2021. Dietary *Lactobacillus acidophilus* and mannan-oligosaccharides alter the lipid metabolism and health indices in broiler chickens. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 13 (3), 633–646. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09717-9>.

- Eder, K., Kirchgesner, M., 1994. Levels of polyunsaturated fatty acids in tissues from zinc-deficient rats fed a linseed oil diet. *Lipids* 29 (12), 839–844. <https://doi.org/10.1007/BF02536251>.
- FAO 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO Food Nutr. Pap. 91, 1–166.
- Fawzy, M.M., El-Sadawi, H.A., El-Dien, M.H., Mohamed, W.A.M., 2016. Hematological and biochemical performance of poultry following zinc oxide and sodium selenite supplementation as food additives. *Ann. Clin. Pathol.* 4 (4), 1076. <https://doi.org/10.47739/2373-9282/1076>.
- Feng, X., Liu, P., Zhou, X., Li, M.T., Li, F.L., Wang, Z., Meng, Z., Sun, Y.P., Yu, Y., Xiong, Y., Yuan, H.X., Guan, K.L., 2016. Thromboxane A2 activates YAP/TAZ protein to induce vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Biol. Chem.* 291 (36), 18947–18958. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739722>.
- Fernández, M., Ordóñez, J.A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C., de la Hoz, L., 2007. Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chem.* 101, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.006>.
- Fletcher, D.L., 2002. Poultry meat quality. *World's Poult. Sci. J.* 58 (2), 131–145. <https://doi.org/10.1079/WPS20020013>.
- Ghaeni, M., Ghahfarokhi, K.N., Zaheri, L., 2013. Fatty acids profile, atherogenic (IA) and thrombogenic (IT) health lipid indices in *Leionathusbindus* and *Upeneusphureus*. *J. Marine Sci. Res. Dev.* 3, 138. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000138>.
- Ghasemi, H.A., Shivazad, M., Mirzapour Rezaei, S.S., Karimi Torshizi, M.A., 2016. Effect of synbiotic supplementation and dietary fat sources on broiler performance, serum lipids, muscle fatty acid profile and meat quality. *Br. Poult. Sci.* 57 (1), 71–83. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1098766>.
- Goluch, Z., Rybarczyk, A., Polawska, E., Haraf, G., 2023. Fatty acid profile and lipid quality indexes of the meat and back fat from porkers supplemented with Em Bokashi probiotic. *Animals* 13 (20), 3298. <https://doi.org/10.3390/ani13203298>.
- Hafez, H.M., Attia, Y.A., 2020. Challenges to the poultry industry: current perspectives and strategic future after the COVID-19 outbreak. *Front. Vet. Sci.* 7, 516. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00516>.
- Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M.Z., Rosser, B.W., Rinkevich, Y., Reshef, R., Rozenboim, I., Wleklinski-Lee, M., Yablonska-Reuveni, Z., 2004. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev. Dyn.* 231 (3), 489–502. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20151>.
- Hohtola, E., 2002. Facultative and obligatory thermogenesis in young birds: a cautionary note. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 131 (4), 733–739. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00011-9).
- Hossain, M.E., Ko, S.Y., Kim, G.M., Firman, J.D., Yang, C.J., 2012. Evaluation of probiotic strains for development of fermented *Alisma canaliculatum* and their effects on broiler chickens. *Poult. Sci.* 91 (12), 3121–3131. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02333>.
- Jayapala, H.P.S., Lim, S.Y., 2023. N-3 polyunsaturated fatty acids and gut microbiota. *Comb. Chem. High. Throughput Screen.* 26 (5), 892–905. <https://doi.org/10.2174/1386207325666220701121025>.
- Jung, U.J., Lee, M.K., Park, Y.B., Kang, M.A., Choi, M.S., 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (7), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.002>.
- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S., Wong, M.C.V.L., Ho, Y.W., 2006. Effects of *Lactobacillus* feed supplementation on cholesterol, fat content and fatty acid composition of the liver, muscle and carcass of broiler chickens. *Anim. Res.* 55 (1), 77–82. <https://doi.org/10.1051/animres:2005043>.
- Kelly, L., Alworth, L., 2013. Techniques for collecting blood from the domestic chicken. *Lab. Anim.* 42, 359–361. <https://doi.org/10.1038/labana.394>.
- Kien, C.L., Bunn, J.Y., Stevens, R., Bain, J., Ikayeva, O., Crain, K., Koves, T.R., Muoio, D. M., 2014. Dietary intake of palmitate and oleate has broad impact on systemic and tissue lipid profiles in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 99 (3), 436–445. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.070557>.
- Kucharski, M., Kaczor, U., 2014. Stearoyl-CoA desaturase—the lipid metabolism regulator. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 68, 334–342. <https://doi.org/10.5604/17322693.1095856>.
- Kucuk, O., 2008. Zinc in a combination with magnesium helps reducing negative effects of heat stress in quails. *Biol. Trace Elem. Res.* 123 (1–3), 144–153. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8083-6>.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002. Two antioxidative strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 72 (3), 215–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00674-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00674-2).
- Kwiecień, M., Kasperk, K., Grela, E., Jeżewska-Witkowska, G., 2015. Effect of caponisation on the production performance, slaughter yield and fatty acid profile of muscles of Greenleg Partridge cocks. *J. Food Sci. Technol.* 52 (11), 7227–7235. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1856-6>.
- Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A., Krusiński, R., Kwiatkowska, K., 2014. Sensory evaluation of breast meat of broilers fed Fe chelate with glycine. *Probl. Hig. Epidemiol.* 95 (1), 134–137.
- Lee, S.H., Kim, C.N., Ko, K.B., Park, S.P., Kim, H.K., Kim, J.M., Ryu, Y.C., 2019. Comparisons of beef fatty acid and amino acid characteristics between jeju black cattle, hanwoo, and wagyu breeds. *Food Sci. Anim. Resour.* 39 (3), 402–409. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e33>.
- Li, Z., Yi, C.X., Katiraei, S., Kooijman, S., Zhou, E., Chung, C.K., Gao, Y., van den Heuvel, J.K., Meijer, O.C., Berbee, J.F.P., Heijink, M., Giera, M., Willems van Dijk, K., Groen, A.K., Rensen, P.C.N., Wang, Y., 2018. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut* 67 (7), 1269–1279. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314050>.
- Liu, L., Li, Q., Yang, Y., Guo, A., 2021. Biological function of short-chain fatty acids and its regulation on intestinal health of poultry. *Front. Vet. Sci.* 8, 736739. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.736739>.
- Lumeij, J.T., 1987. Avian clinical pathology. General considerations. *Vet. Q.* 9 (3), 249–254. <https://doi.org/10.1080/01652176.1987.9694109>.
- Maehre, H.K., Dalheim, L., Edvinsen, G.K., Elvevoll, E.O., Jensen, I.J., 2018. Protein determination — Method matters. *Foods* 7 (1), 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>.
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A., Raats, J.G., 2009. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: a review. *Food Chem.* 112 (2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.103>.
- Murphy, J.P., Koch, V.W., Briscoe, J.A., Vinke, C.M., Schoemaker, N.J., Meijboom, F.L. B., van Zeeland, Y.R.A., Endenburg, N., Greenacre, C.B., 2016. Advancements in management of the welfare of avian species, in: Speer, B.L. (Ed), *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*. W.B. Saunders, Philadelphia, USA, pp. 669–718. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4671-2.00031-8>.
- Muyyarikkandy, M.S., Schlesinger, M., Ren, Y., Gao, M., Liefeld, A., Reed, S., Amalaradjou, M.A., 2023. In ovo probiotic supplementation promotes muscle growth and development in broiler embryos. *Poult. Sci.* 102 (7), 102744. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102744>.
- Nakamura, H., Sekiguchi, A., Ogawa, Y., Kawamura, T., Akai, R., Iwakaki, T., Makiguchi, T., Yokoo, S., Ishikawa, O., Motegi, S.I., 2019. Zinc deficiency exacerbates pressure ulcers by increasing oxidative stress and ATP in the skin. *J. Dermatol. Sci.* 95 (2), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.07.004>.
- Noto, D., Fayer, F., Cefalù, A.B., Altieri, I., Palesano, O., Spina, R., Valenti, V., Pitrone, M., Pizzolanti, G., Barbagallo, C.M., Giordano, C., Averna, M.R., 2016. Myristic acid is associated to low plasma HDL cholesterol levels in a Mediterranean population and increases HDL catabolism by enhancing HDL particles trapping to cell surface proteoglycans in a liver hepatoma cell model. *Atherosclerosis* 246, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015>.
- Paengkoum, P., Han, Y., Traiyakun, S., Khotsakdee, J., Paengkoum, S., 2011. Supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* or *Lactobacillus acidophilus* in goats diets. *WASET* 59, 1976–1980.
- Park, Y.H., Hamidon, F., Rajangan, C., Soh, K.P., Gan, C.Y., Lim, T.S., Abdullah, W.N., Liong, M.T., 2016. Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 36 (5), 567–576. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.5.567>.
- Rioux, V., Péron, F., Legrand, P., 2011. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: n-terminal myristoylation and other modulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.09.005>.
- Ross, G.R., Van Nieuwenhove, C.P., Gonzalez, S.N., 2012. Fatty acid profile of pig meat after probiotic administration. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5974–5978. <https://doi.org/10.1021/jf1205360h>.
- Sahin, K., Kucuk, O., 2003. Zinc supplementation alleviates heat stress in laying Japanese quail. *J. Nutr.* 33 (9), 2808–2811. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2808>.
- Sahin, K., Sahin, N., Kucuk, O., Hayirli, A., Prasad, A.S., 2009. Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: a review. *Poult. Sci.* 88 (10), 2176–2183. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00560>.
- Sahin, K., Smith, M.O., Onderci, M., Sahin, N., Gursu, M.F., Kucuk, O., 2005. Supplementation of zinc from organic or inorganic source improves performance and antioxidant status of heat-distressed quail. *Poult. Sci.* 84, 882–887. <https://doi.org/10.1093/ps/84.6.882>.
- Salma, U., Miah, A.G., Maki, T., Nishimura, M., Tsujii, H., 2007. Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poult. Sci.* 86 (9), 1920–1926. <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.1920>.
- Sirri, F., Castellini, C., Bianchi, M., Petracci, M., Meluzzi, A., Franchini, A., 2011. Effect of fast-, medium- and slow-growing strains on meat quality of chickens reared under the organic farming method. *Animals* 5, 312–319. <https://doi.org/10.1017/S175173111000176X>.
- Sloan, H.J., 1936. The operative removal of the yolks from newly-hatched chicks. *Poult. Sci.* 15 (1), 23–27. <https://doi.org/10.3382/ps.0150023>.
- Speake, B.K., Murray, A.M., Noble, R.C., 1998a. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* 37, 1–32. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(97\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(97)00012-X).
- Speake, B.K., Noble, R.C., Murray, A.M., 1998b. The utilization of yolk lipids by the chick embryo. *World's Poult. Sci. J.* 54 (4), 319–334. <https://doi.org/10.1079/WPS19980022>.
- Stawarska, A., Czerwonka, M., Wyrębiak, R., Wrzesień, R., Bobrowska-Korczak, B., 2021. Zinc affects cholesterol oxidation products and fatty acids composition in rats' serum. *Nutrients* 13 (5), 1563. <https://doi.org/10.3390/nu13051563>.
- Surai, P.F., 1999b. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *Br. Poult. Sci.* 40 (3), 397–405. <https://doi.org/10.1080/00071669987511>.
- Surai, P.F., Fisinin, V.I., Karadas, F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* 2 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.01.001>.
- Surai, P.F., Speake, B.K., Noble, R.C., Sparks, N.H., 1999a. Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biol. Trace Elem. Res.* 68 (1), 63–78. <https://doi.org/10.1007/BF02784397>.
- Tang, X., Liu, X., Liu, H., 2021. Effects of dietary probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on carcass traits, meat quality, amino acid, and fatty acid profile of broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* 8, 767802. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.767802>.

- Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T., 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338 (8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M).
- Valsta, L.M., Tapanainen, H., Männistö, S., 2005. Meat fats in nutrition. *Meat Sci* 70 (3), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.016>.
- Wessely-Szponder, J., Belkot, Z., Bobowiec, R., Kosior-Korzecka, U., Wójcik, M., 2015. Transport induced inflammatory responses in horses. *Pol. J. Vet. Sci.* 18 (2), 407–413. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0052>.
- Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., 2015. The effects of copper-glycine complexes on chemical composition and sensory attributes of raw, cooked and grilled chicken meat. *J. Food Sci. Technol.* 52 (7), 4226–4235. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1510-8>.
- Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Grela, E.R., Tomaszewska, E., Klebaniuk, R., 2016. The chemical composition and sensory properties of raw, cooked and grilled thigh meat of broiler chickens fed with Fe-Gly chelate. *J. Food Sci. Technol.* 53 (10), 3825–3833. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2374-x>.
- Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Jachimowicz-Rogowska, K., Kisłowa, S., Zasadna, Z., Yanovych, D., 2023. Assessment of the chemical composition and nutritional quality of breast muscle from broiler chickens receiving various levels of Fe glycine chelate. *Agriculture* 13, 1455. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071455>.
- Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Mieczan, T., Kwiatkowska, K., Jachimowicz, K., 2021. The effect of Cu, Zn and Fe chelates on the antioxidative status of thigh meat of broiler chickens. *Animal* 15, 100367. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100367>.
- Wójcik, M., Bobowiec, R., Silmanowicz, P., 2005. Changes of bile secretion and liver peroxidation under influence of glucocorticoids in sheep. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska DD Medicina Veterinaria* 60, 132–140.
- Woloszyn, J., Haraf, G., Okruszek, A., Werenśka, M., Gołuch, Z., Teleszko, M., 2020. Fatty acid profiles and health lipid indices in the breast muscles of local Polish goose varieties. *Poult. Sci.* 99 (2), 1216–1224. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.026>.
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., Enser, M., 2004. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* 66 (1), 21–32. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6).
- Wu, T., Wang, G., Xiong, Z., Xia, Y., Song, X., Zhang, H., Wu, Y., Ai, L., 2022. Probiotics interact with lipids metabolism and affect gut health. *Front. Nutr.* 9, 917043. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.917043>.
- Xiao, C., Comer, L., Pan, X., Everaert, N., Schroyen, M., Song, Z., 2024. Zinc glycinate alleviates LPS-induced inflammation and intestinal barrier disruption in chicken embryos by regulating zinc homeostasis and TLR4/NF-κB pathway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 272, 116111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116111>.
- Yang, X., Zhang, B., Guo, Y., Jiao, P., Long, F., 2010. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on fat deposition and meat quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 89 (2), 254–260. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00234>.
- Zhang, L., Zhang, R., Jia, H., Zhu, Z., Li, H., Ma, Y., 2021. Supplementation of probiotics in water beneficial growth performance, carcass traits, immune function, and antioxidant capacity in broiler chickens. *Open Life Sci* 16 (1), 311–322. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0031>.
- Zhang, W.Q., Zhao, T.T., Gui, D.K., Gao, C.L., Gu, J.L., Gan, W.J., Huang, W., Xu, Y., Zhou, H., Chen, W.N., Liu, Z.L., Xu, Y.H., 2019. Sodium butyrate improves liver glycogen metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J. Agric. Food Chem.* 67 (27), 7694–7705. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02083>.
- Zhao, K., Shen, C., Lu, Y., Huang, Z., Li, L., Rand, C.D., Pan, J., Sun, X.D., Tan, Z., Wang, H., Xing, G., Cao, Y., Hu, G., Zhou, J., Xiong, W.C., Mei, L., 2017a. Muscle Yap is a regulator of neuromuscular junction formation and regeneration. *J. Neurosci.* 37 (13), 3465–3477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2934-16.2017>.
- Zhao, M.M., Gao, T., Zhang, L., Li, J.L., Lv, P.A., Yu, L.L., Gao, F., Zhou, G.H., 2017. Effects of in ovo feeding of creatine pyruvate on the hatchability, growth performance and energy status in embryos and broiler chickens. *Animal* 11 (10), 1689–1697. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000374>.
- Zhou, T.X., Chen, Y.J., Yoo, J.S., Huang, Y., Lee, J.H., Jang, H.D., Shin, S.O., Kim, H.J., Cho, J.H., Kim, I.H., 2009. Effects of chitoooligosaccharide supplementation on performance, blood characteristics, relative organ weight, and meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.* 88 (3), 593–600. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00285>.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Krystyna Pierzchata-Koziec,
University of Agriculture in Krakow, Poland

REVIEWED BY

Jan Jankowski,
University of Warmia and Mazury in
Olsztyn, Poland
Deependra Paneru,
University of Georgia, United States

*CORRESPONDENCE

Łukasz S. Jarosz,
✉ lukasz.jarosz@up.lublin.pl

RECEIVED 12 June 2025

ACCEPTED 21 August 2025

PUBLISHED 22 September 2025

CITATION

Ciszewski A, Jarosz ŁS, Grądzki Z, Marek A,
Kaczmarek B, Hejdysz M and Rysiak A (2025)
Influence of a multi-strain probiotic and
zinc-glycine chelate, administered *in ovo*, on
immune response in newly hatched chicks.
Front. Physiol. 16:1646143.
doi: 10.3389/fphys.2025.1646143

COPYRIGHT

© 2025 Ciszewski, Jarosz, Grądzki, Marek,
Kaczmarek, Hejdysz and Rysiak. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](#). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered *in ovo*, on immune response in newly hatched chicks

Artur Ciszewski ¹, Łukasz S. Jarosz ^{1*},
Zbigniew Grądzki ¹, Agnieszka Marek ²,
Beata Kaczmarek ³, Marcin Hejdysz ⁴ and Anna Rysiak ⁵

¹Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland, ²Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland,

³Department and Clinic of Animal Internal Diseases, Sub-Department of Internal Diseases of Farm Animals and Horses, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland, ⁴Department Of Animal Breeding And Product Quality Assessment, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, ⁵Department of Botany, Mycology, and Ecology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland

Introduction: The supplementation of chicken embryos with bioactive compounds may elicit a beneficial effect on the development of their gut microbiome and enhance protection against infectious agents after hatching. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of *in ovo* co-supplementation with a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate on the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, acute-phase proteins, and immunoglobulins in the peripheral blood and tissues of broiler chickens on the day of hatching and 7 days post hatching. The effect of supplementation on the growth parameters of chickens was assessed as well.

Methods: The study was conducted on 1,500 hatching eggs from a broiler breeding flock (Ross × Ross 308) at 36 weeks. ELISA kits were used to determine levels of acute-phase proteins and immunoglobulins. Expression of immunoglobulins was determined by means of qRT-PCR.

Results: The results indicate enhanced synthesis of acute-phase proteins in the liver and increased levels of serum amyloid A in the small intestine tissue, as well as IgA and IgM mRNA and suppressed synthesis of pro-inflammatory cytokines IFN-γ and TNF-α. During the cumulative experimental period (days 0–42), the mean body weight gain (BWG) and feed intake (FI) in the group supplemented with a multi-strain probiotic were statistically significantly lower than the control group.

Discussion: It may be concluded that the combined *in ovo* use of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate modulates the immune response, helps maintain the balance between the synthesis of Th1 and Th2 cytokines, inhibits inflammatory processes, and stimulates immune system development.

KEYWORDS

in ovo, chelated zinc, multi-strain probiotic, cytokines, acute-phase proteins, immunoglobulins

1 Introduction

The growing demand for poultry products has contributed to the growth of poultry production and necessitated the development of new technologies for rearing chickens with favorable nutritional and dietary qualities (Mottet and Tempio, 2017; Dong et al., 2024). A critical time in poultry rearing is the peri- and post-hatching period, which significantly influences the survival rate of chicks and their weight gain (Almeida et al., 2006). One recently promoted method for improving the health of chicks entails the *in ovo* administration of bioactive compounds to the embryo (Kpodo and Proszkowiec-Weglarz, 2023). This technique enables the formation of a beneficial profile of the intestinal microbiome at the embryo stage, reduces the extent of oxidative stress, enhances protection against infectious agents by increasing immunization efficiency, and increases the energy reserves of the embryo and chick (Arain et al., 2022; Ayalew et al., 2023). A subject of particular interest is the use of multi-strain probiotics and organic forms of zinc, which when administered *in ovo* enhance the immune system of chickens by stimulating the production of antibodies (Zulkifli et al., 2000; Kabir et al., 2004; Haghighi et al., 2006), T lymphocytes, and the pro-inflammatory cytokines IFN- γ , IL-12, and IL-1 β , which in turn stimulate Th1 immune response and help increase the mass of lymphoid organs (Incharoen et al., 2019; Zhang et al., 2021; Rousseaux et al., 2023). Similarly, the administration of Zn in organic form in the post-hatch period promotes the growth, differentiation, and activation of immune cells, including macrophages, B, and T cells (mainly TCD4+), and enhances phagocytosis (Jarosz et al., 2017a). It also promotes the synthesis and secretion of antibodies, increases the antioxidative potential of cells (Huang et al., 2007; Moghaddam and Jahanian, 2009; Sahoo et al., 2014), and inhibits IL-1 β and IL-6 production, thereby reducing inflammation in the cells (Jin et al., 2023).

An even more beneficial effect on the immune system of birds can be achieved by combining multi-strain probiotics and organic forms of zinc *in ovo* (Ciszewski et al., 2023a). This administration strategy promotes mRNA expression of cytokines in the cecal tonsils, bursa of Fabricius, and spleen in the post-hatch period (Alizadeh et al., 2020). Similarly, *in ovo* administration of Zn stimulates cellular immune mechanisms in the post-hatch period and increases mRNA expression of a zinc exporter in the small intestine and of brush border enzymes and transporter genes (Tako et al., 2005). *In ovo* administration of probiotics also ensures the early multiplication of beneficial bacteria in the intestines, leading to changes in the intestinal microbiome (Schokker et al., 2015). As a consequence of these modifications, the microbes contained in the probiotic positively influence immunocompetent cells of the intestinal epithelium and modulate cellular and humoral mechanisms of the immune response, helping reduce bacterial infections in chickens in the early stage of life (de Oliveira et al., 2014; Schokker et al., 2015). However, these interactions can also upset homeostasis in the intestines and lead to inflammation. Similarly, excessive *in ovo* administration of highly bioavailable zinc in chelated form can cause reduced hatching rates in poultry (Kim and Kang, 2022), inflammatory lesions, erosion in the gut, and changes in the biodiversity of the intestinal microbiome (Starke et al., 2014). Data from the literature indicate that alongside its beneficial effects, the *in ovo* administration of both substances can induce

stress in the embryo, leading to inflammation and acute-phase response, which is one of the components of the innate immune response (Ciszewski et al., 2023b). This leads to the synthesis of acute-phase proteins (APP) in the liver, which upon release to the bloodstream become markers of ongoing inflammation (Gruys et al., 2005). The development of acute-phase response (APR) is accompanied by a decrease in the concentration of zinc in the fluids and tissues, which is redistributed from the blood—mainly to the liver (Liuzzi et al., 2006).

The mechanisms involved in the immune response in poultry following the application of multi-strain probiotics together with zinc-glycine (Zn-Gly) chelates are not well understood. We therefore hypothesized that *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate may modulate the early immune response in broiler chickens by influencing cellular and humoral mechanisms, including the synthesis of immunoregulatory proteins involved in maintaining the Th1/Th2 balance. The aim of this study was to determine the impact of the *in ovo* co-supplementation of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate on the concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines, acute-phase proteins, and immunoglobulins in the peripheral blood and tissues of broiler chickens on the day of hatching (DOH) and at 7 days post-hatch, as well as on the weights of the lymphatic organs. Additional analyses were conducted to assess the expression of mRNA immunoglobulin in the small intestine and the effect of these preparations on the growth parameters of chickens throughout the rearing period. The results of this study will help elucidate the role of multi-strain probiotics and Zn-Gly chelate in immune processes in chickens in the first few days of their life.

2 Materials and methods

2.1 Experimental animals and ethics committee approval

The research material comprised 1,500 hatching eggs obtained from a commercial flock of broiler breeders at the age of 36 weeks (Ross $\times$ Ross 308) delivered to the Experimental Station at the Poznań University of Life Sciences (ul. Gorzyń 4, Międzychód commune, Poland). All procedures used in the research were approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval no. 106/2022 of 17 October 2022).

2.2 Incubation of eggs and *in ovo* supplementation with the analyzed preparations

The eggs (1,500) were stored at 21°C under commercial conditions for 24 h before being placed in the incubation chamber. They were randomly distributed and incubated in JARSON Model JD-18 incubators (Gostyń, Poland) at the Experimental Station of the Department of Animal Nutrition and Feed Management Gorzyń/Międzychód (Poland). For the first 18 days, the eggs were incubated under standard commercial conditions: 37.8°C and relative humidity (RH) 55%–60%. On the 19th day of incubation

(DOI), they were transferred to a JARSON Model ATLAS-180 hatching chamber (Gostyń, Poland). From days 19–21, the hatching parameters were 37.7–38.1 °C and RH 60%–65%. At 7 and 17 DOI, all eggs were candled and cracked, and unfertilized and dead embryonic eggs were removed.

On embryonic day 17, 1,400 fertilized eggs were randomly distributed into four treatment groups, with 10 replicates per group and 35 eggs per replicate (350 eggs per group). They were assigned to groups according to the preparation administered *in ovo* as follows: eggs injected with sterile 0.9% physiological saline (control group–I); eggs injected with a multi-strain probiotic–group II (1×10^5 CFU/egg *Saccharomyces cerevisiae*; 1×10^7 CFU/egg *Lactocaseibacillus casei*; 1×10^7 CFU/egg *Lactiplantibacillus plantarum*); eggs injected with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate– group III (1×10^5 CFU/egg *S. cerevisiae*; 1×10^7 CFU/egg *L. casei*; 1×10^7 CFU/egg *L. plantarum*; 100 µg/egg Zn-Gly); eggs injected with Zn-Gly – group IV (100 µg/egg Zn-Gly). The eggs from each group received an equal volume (500 µL) of 0.9% physiological saline or a bioactive compound, injected *in ovo* into the amniotic sac. The *in ovo* injection procedure has been described in detail by Alizadeh et al. (2020), Alizadeh et al. (2021), Ciszewski et al. (2023a), and Ciszewski et al. (2023b).

2.3 Bioactive compounds

The multi-strain probiotic EM Provet used in the experiment was manufactured by Greenland Technologia EM (Janowiec, Poland); its exact composition has been described by Ciszewski et al. (2023a). EM Provet was provided in powdered form and diluted in PBS (phosphate-buffered saline) to obtain a solution containing 1×10^5 CFU *S. cerevisiae*, 1×10^7 CFU *L. casei*, and 1×10^7 CFU *L. plantarum* in a 100 µL of solution. The Zn-Gly chelate used in the experiment was manufactured by Arkop Sp. z o.o. (Bukowno, Poland). The Zn-Gly powder contained 250 mg of Zn-Gly per g of product. The powder was dissolved in deionized water to obtain solutions containing 100 µg of Zn-Gly/100 µL MQ water. In experimental groups III and IV, 100 µg of Zn-Gly/100 µL MQ water was administered to each egg, corresponding to 30.33 µg of elemental Zn per egg. All procedures are described in detail by Ciszewski et al. (2023a) and Ciszewski et al. (2023b).

2.4 Animals and feeding program

After hatching, 150 one-day-old male chicks from each group were selected at random for analysis. Each treatment group had 10 replicates with 15 birds per replicate. The 42-day growing trial was conducted at the Experimental Station of the Department of Animal Nutrition and Feed Management, Gorzyń/Miedzychód (Poland). The experiment was performed in fully controlled environmental conditions and in accordance with the recommendations for this line (Aviagen, Ross Broiler Management Handbook, Ross 308/308 FF Broiler: Performance Objectives; Aviagen, Ross Broiler Management Handbook). The birds were reared on wood shavings in pens measuring 1.2 × 0.8 m. The pens were equipped with feeding lines and nipple drinkers. For the first 3 days, the temperature in the experimental room at the experimental station was maintained

at 33 °C ± 1 °C and was then successively lowered by 3 °C per week until reaching 24 °C ± 1 °C. The lighting program was 24 h of light for the first 10 days and then 19 h of light and 5 h of darkness. Relative humidity (RH) was maintained at 60% ± 10% throughout the experimental period. Water and feed were provided *ad libitum* throughout the entire experimental period. The birds were fed a basal diet with no coccidiostats or antibiotics. The feed was provided in crumbled form, prepared at the Experimental Station at the Poznań University of Life Sciences in Gorzyń (Poland) using a SKIOLD SK2500 disc mill and a Zuptor H710/3 horizontal mixer. The basal feed was formulated in accordance with nutritional recommendations for Ross 308 broiler chickens (Aviagen, Broiler Nutrition Specifications). The chemical composition and ingredient composition of the feed are presented in Table 1. The nutrient content of the diets was calculated based on the chemical composition of the raw feedstuffs and the metabolizable energy value.

2.5 Blood and tissue sample collection

Blood and tissues were sampled from three birds per replicate (30 samples in total) in each group. The samples were not pooled. Blood samples were collected on DOH from chicks killed by cervical dislocation (Murphy et al., 2016) (before feeding) and again from the wing vein at 7 days post-hatch. Blood was collected into tubes with a clotting activator (Vacuette, Medlab Products, Raszyn, Poland). The samples were thence transported to the laboratory at +4 °C within 1 h and centrifuged at room temperature (22 °C) for 15 min at 1,000 × g. The serum was stored at –80 °C until analysis.

Tissues were collected for cytokine, immunoglobulin and acute-phase protein analysis from the same chickens on the same days as the blood. On DOH, samples were collected from the liver (caudal part of the right liver lobe), small intestine (ileum–midsection between Meckel's diverticulum and the ileocecal junction), large intestine (midsection between the ileo–cecal–colic junction and cloaca), and yolk sac (the contents of the yolk sac were collected after its removal according to Sloan (1936)). At 7 days post-hatch, tissues were collected from the liver and the small and large intestine. The tissues were washed in ice-cold saline (87 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0.5 mM CaCl₂, 7 mM MgSO₄, 25 mM glucose, and 75 mM sucrose, pH 7.4) and stored at –80 °C for subsequent analysis. Tissue samples were not pooled.

At the same time, samples of the ileum (middle part of the ileum, 2 cm) were collected from the same birds and snap-frozen in liquid nitrogen. They were stored at –80 °C for immunoglobulin mRNA analysis.

2.6 Growth performance

Growth performance parameters, including body weight gain (BWG), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR), were recorded on days 10, 24, and 42. Calculations were made for the starter (0–10 days), grower (10–24 days), and finisher (24–42 days) period, as well as for the cumulative experimental period (0–42 days). FI and FCR were recorded on a per-pen basis on days 10, 24, and 42. FCR for all experimental groups during the 42-day period

TABLE 1 Ingredients and chemical composition of diets (as-fed basis) (%).

Percentage %			
Ingredient	Starter feed (days 0–10)	Grower feed (days 10–24)	Finisher feed (days 24–42)
Wheat	35.02	40.00	50.00
Soybean meal	34.02	29.40	22.88
Maize	22.54	17.21	10.03
Rapeseed oil	2.01	2.50	4.11
Lard	2.00	2.97	3.50
Rapeseed meal	1.00	5.00	7.00
Premix without coccidiostat ^a	1.00	1.00	1.00
Monocalcium phosphate	0.72	0.55	0.41
Calcium carbonate	0.62	0.44	0.26
L-Methionine	0.30	0.24	0.18
L-Lysine	0.22	0.18	0.20
Sodium chloride	0.20	0.20	0.20
NaHCO ₃	0.12	0.16	0.12
Threonine	0.12	0.08	0.07
L-Valine	0.12	0.06	0.03
OptiPhos [®] (0.01%) ^b	0.01	0.01	0.01
Calculated nutritional value			
AME _N MJ/kg	12.47	12.81	13.20
Crude protein	22.7	21.54	19.50
Crude fat	6.02	6.50	7.13
P available	0.48	0.42	0.36
Ca	0.96	0.75	0.65
Na	0.16	0.18	0.18
Cl	0.16	0.17	0.17
Lys dig	1.25	1.18	1.08
Met dig	0.6	0.51	0.48
Thr dig	0.84	0.79	0.72
Val dig	0.94	0.91	0.84

^aVitamin–mineral premix provided per kg diet: Mn, 55 mg; Zn, 50 mg; Fe, 80 mg; Cu, 5 mg; Se, 0.1 mg; I, 0.36 mg; Na, 1.6 g. retinol, 2.48 mg; cholecalciferol, 25 µg; D1-α-tocopherol, 60 mg; cyanocobalamin, 0.012 mg; menadione sodium bisulfite, 1.1 mg; niacin, 53 mg; choline chloride, 1,020 mg; folic acid, 0.75 mg; biotin, 0.25 mg; riboflavin, 5.5 mg; xylanase (Econase HCP, 4000; AB, vista, Marlborough, UK), 4 mg.

^bOptiPhos[®]: 6-phytase derived from *Escherichia coli*

was calculated as mean feed intake/mean weight. The body weight of the chicks after hatching and the mortality rate throughout the experiment were also determined.

2.7 Assays of acute-phase proteins and immunoglobulins in chicken serum and tissues

ELISA kits for chicken haptoglobin (Hp; catalog number E0016Ch), alpha 1-acid glycoprotein (α -1-AGP; catalog number EA0033Ch), and ceruloplasmin (catalog number EA0031Ch) were obtained from BT Lab (Bioassay Technology Laboratory), Shanghai, China. ELISA kits for chicken serum amyloid A (SAA) (catalog number orb561505) and mannose-binding lectin (MBL) (catalog number orb549452) were obtained from Biorbyt Ltd, Cambridge, United Kingdom.

ELISA kits for chicken IgM (catalog number E-EL-Ch0367), IgA (catalog number E-EL-Ch0620), and IgY (catalog number E-EL-Ch0001) were obtained from Elabscience Biotechnology Co., Ltd, Houston, USA. The assays were performed according to the manufacturer's specifications. Levels of acute-phase proteins and immunoglobulins were determined on the day of hatch (DOH) in the serum, liver, small and large intestine, and yolk sac and on day 7 in the serum, liver, and small and large intestine. The α -1-AGP content was expressed as $\mu\text{g/mL}$ total protein. Hp, ceruloplasmin, SAA, MBL, IgA, and IgY contents were expressed as ng/mL total protein. IgM content was expressed as pg/mL total protein.

2.8 Assays of cytokines in chicken serum and tissues

ELISA kits were used to determine IL-2, IL-12, TNF- α , TGF- β 1 (Qayee-Bio, Shanghai, China, no. QY-E80014, QY-E80157, QY-E80030, and QY-E80041), IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ (EIAab Science Inc., Wuhan, Hubei, China, no. E0079c, E0080c, E0056c, and E0049c), and IL-1 β (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China, no. ECH0040) in the chicken serum and tissues. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in triplicate.

2.9 Measurement of organ weights

Immediately after blood sampling, the spleen, bursa of Fabricius, and thymus were excised, stripped of adhering tissue, and weighed individually. The weight was expressed as relative weight to live body weight. The entire procedure was performed as described by Kim et al. (2016).

2.10 mRNA expression of immunoglobulins

Total RNA was prepared from the homogenized snap-frozen ileum samples of each bird using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Crawley, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. Quality and purity were assessed using the ND-1000

spectrophotometer at 260 nm/280 nm (NanoDrop Technologies, Silverside, Wilmington, DE, USA). Reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed using the SuperScript II first-strand cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Chorzów, Poland). All procedures are described in Jarosz et al. (2017b).

The expression of immunoglobulins IgA, IgY, and IgM was determined by qRT-PCR using the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom) (Lammers et al., 2010).

The primer sequences used for qRT-PCR are listed in Table 2. Each sample was subjected to qRT-PCR in triplicate, and the mean values were used for analysis. The threshold cycle (CT) values for the genes of interest were normalized to the average CT value of the housekeeping genes, and the relative expression of each replicate was calculated as $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Applied Biosystems user Bulletin #2; ABI prism 7700 detection system, 2001). The reference gene used was β -actin (housekeeping gene). CT values for each sample were standardized for β -actin RNA. All research procedures have been described in detail by Pfaffl (2001) and Moreira Filho et al. (2018).

2.11 Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed using the Statistica 13.2 PL package (StatSoft, Krakow, Poland). The significance of differences between the control (I) and experimental groups (II–IV) was tested for the levels of selected cytokines, immunoglobulins, acute-phase proteins, relative weight of lymphoid organs, and mRNA expression ratio in the ileum for the three immunoglobulins IgA, IgY, and IgM at two time points in early chicken life: DOH and 7 days post hatching (dependent variables). After evaluating data distribution and the equality of variances, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* test was used for comparisons between experimental groups at a given age, and the t-test was deployed to analyze differences within the same group between the two analytical points. The same letters in tables indicate the absence of statistically significant differences. Results are expressed as mean and $\pm$ standard deviation ($\pm$ SD), and differences were considered significant at $p \leq 0.05$. The results are presented in Tables 3–8.

3 Results

3.1 Chicken growth performance

In the period from 0 to 10 days of life, the BWG was statistically significantly higher in group III than in groups II and I (control). In the periods from 10 to 24 and from 24 to 42 days of life, BWG was statistically significantly lower in group II than in the other groups. Similarly, BWG in group II was statistically significantly lower than in the other groups during the cumulative experimental period (days 0–42). During this period (days 0–42), FI was statistically significantly lower in group II than in the other groups. From 0 to 10 days of age, FI was statistically significantly lower in group II than in the groups I and IV. FI in group II was also statistically significantly lower than in the other groups from 10 to 24 days of

TABLE 2 Primer sequences.

Gene	Primer sequence (5'→ 3')	Accession number
IgY	F: ATC-ACG-TCA-AGG-GAT-GCC-CG R: ACC-AGG-CAC-CTC-AGT-TTG-G	X07174.1
IgA	F: GTC-ACC-GTC-ACC-TGG-ACT-ACA R: ACC-GAT-GGT-CTC-CTT-CAC-ATC	S40610
IgM	F: GCA-TCA-GCG-TCA-CCG-AAA-GC R: TCC-GCA-CTC-CAT-CCT-CTT-GC	X01613.1
β -Actin	F: ACCACTGGCATTGTGATGGACTCT R: TCCTTGATGTACGGACGATTTC	NM_205518

F, forward; R, reverse.

age and statistically significantly lower than in control group (I) from 24 to 42 days of age. FCR in group III was statistically significantly lower than in the other groups from 0 to 10 days of age. In the period between 10 and 24 days of life, a statistically significantly higher FCR was recorded in group II compared to groups I and III (Table 7). No statistically significant differences in the initial body weight of chicks were observed between the groups (Table 7). Compared to the control group, a significantly higher total mortality rate of chicks was observed in group II (3.33%) (Supplementary Table S1).

3.2 Levels of acute-phase proteins in chicken serum and tissues

On DOH, the content of α -1-AGP in the serum of chickens in group IV was statistically significantly higher than in the control group. At 7 days post-hatch, the serum content of α -1-AGP was statistically significantly higher in group III than in groups I and IV. Analysis of α -1-AGP in chicken livers on DOH showed its statistically significantly higher content in the I and III groups than in groups II and IV. At 7 days, the content of α -1-AGP in the chicken liver was statistically significantly higher in group II than in groups I and IV. The content of α -1-AGP in the small intestine on DOH was statistically significantly lower in group III than in the other groups. Similarly, after 7 days, the content of α -1-AGP was statistically significantly lower in group III than in the other groups. On DOH, the content of α -1-AGP in the large intestine was statistically significantly lower in group IV than in groups I and III. After 7 days, the content of α -1-AGP in the large intestine was statistically significantly lower in group IV than in groups II and III. The content of α -1-AGP in the yolk sac was statistically significantly higher in groups III and IV than in the control group (I) (Table 4).

The Hp content in the livers of birds in group III on DOH was statistically significantly higher than in the control group. At 7 days, the Hp content in the liver of chickens was statistically significantly lower in group III than in group IV. On DOH, the content of Hp in the small intestine was statistically significantly higher in group II than in groups I and III. At 7 days, the content of Hp in the small intestine was statistically significantly higher in group III than in groups II and IV. The content of HP in the large intestine on DOH was statistically significantly higher in group IV

than in the other groups. At 7 days, the content of Hp in the large intestines of birds in group III was statistically significantly higher than in group II (Table 4).

The ceruloplasmin content in the serum of chickens on DOH was statistically significantly lower in groups III and IV than in groups I and II. At 7 days, the serum ceruloplasmin content was statistically significantly lower in group III than in groups I and IV. In turn, its content in the livers of chickens on DOH was statistically significantly lower in group II than in groups I and III. At 7 days, the ceruloplasmin content in the liver was statistically significantly lower in group IV than in groups I and III. On DOH, statistically significantly lower ceruloplasmin contents in the small intestine were determined in groups II and III compared to groups I and IV. On DOH, ceruloplasmin content in the large intestine was statistically significantly lower in group IV than in groups I and III. At 7 days, it was statistically significantly lower in groups I and IV than in groups II and III. The ceruloplasmin content in the yolk sac was statistically significantly lower in group I than in groups III and IV (Table 4).

On DOH, the content of SAA in the serum of chickens was statistically significantly lower in group IV than in group III. At 7 days, the serum content of SAA was statistically significantly lower in group III than in the other groups. At 7 days, the SAA content in the liver was statistically significantly lower in group III than in the other groups. On DOH, the SAA content in the small intestine was statistically significantly lower in the control group (I) than in the other groups, whereas at 7 days it was statistically significantly higher in group IV than in the other groups. On DOH, the SAA content in the large intestine was statistically significantly lower in group III than in the other groups. At 7 days, it was statistically significantly higher in group IV than in the other groups. SAA content in the yolk sac was statistically significantly higher in group III than in the other groups (Table 4).

On DOH, the content of MBL in the serum of chickens in group IV was statistically significantly higher than in group II. After 7 days, the serum MBL content in group IV was statistically significantly higher compared to the other groups. On DOH, the MBL content in the livers of chickens in group II was statistically significantly higher than in groups I and III. At 7 days, the MBL content in the livers of chickens was statistically significantly lower in group III than in group IV. On DOH, the content MBL in the small intestine in group

TABLE 3 Comparison of levels of selected cytokines determined in chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$. DOH, on the day of hatch.

Cytokine	Group	DOH					7 days			
		Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine
IL-1 β (pg/mL)	I	50.03 $\pm$ 7.96 ^{ab}	2687.51 $\pm$ 1924.09 ^{ab}	57.19 $\pm$ 26.82 ^a	6.29 $\pm$ 3.01 ^a	289.48 $\pm$ 62.55 ^a	111.86 $\pm$ 44.61 ^a	5083.15 $\pm$ 311.79 ^{ab}	389.37 $\pm$ 36.11 ^a	289.6 $\pm$ 36.97 ^a
	II	21.63 $\pm$ 10.11 ^c	5222.63 $\pm$ 94.24 ^a	55.94 $\pm$ 23.23 ^a	21.64 $\pm$ 7.41 ^a	467.78 $\pm$ 161.92 ^b	17.82 $\pm$ 2.83 ^b	5243.29 $\pm$ 97.77 ^a	354.63 $\pm$ 65.29 ^a	518.2 $\pm$ 74.51 ^b
	III	40.92 $\pm$ 0.71 ^{ab}	4989.65 $\pm$ 32.24 ^{ab}	163.25 $\pm$ 18.63 ^b	19.09 $\pm$ 1.32 ^a	222.7 $\pm$ 38.16 ^a	50.93 $\pm$ 4.83 ^b	5179.78 $\pm$ 121.79 ^{ab}	345.36 $\pm$ 15.71 ^a	548.8 $\pm$ 54.69 ^b
	IV	58.82 $\pm$ 12.7 ^a	474.86 $\pm$ 139.69 ^b	46.58 $\pm$ 16.68 ^a	212.2 $\pm$ 39.97 ^b	209.53 $\pm$ 69.21 ^a	30.32 $\pm$ 6.63 ^b	4838.25 $\pm$ 204.95 ^b	255.68 $\pm$ 50.69 ^b	477.41 $\pm$ 46.98 ^b
p-value		<0.0001	<0.0001	0.002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.01	0.004	0.003
IL-2 (ng/mL)	I	12.2 $\pm$ 5.52 ^{ab}	127.43 $\pm$ 11.95 ^a	15.67 $\pm$ 1.73 ^a	12.26 $\pm$ 2.67 ^a	12.74 $\pm$ 3.27 ^a	7.36 $\pm$ 1.55 ^{ab}	80.33 $\pm$ 3.9 ^a	15.79 $\pm$ 3.06 ^a	9.26 $\pm$ 2.83 ^a
	II	10.81 $\pm$ 5.16 ^{ab}	87.29 $\pm$ 8.18 ^b	15.67 $\pm$ 2.79 ^a	14.35 $\pm$ 1.5 ^a	12.45 $\pm$ 2.71 ^a	3.62 $\pm$ 1.05 ^a	96.59 $\pm$ 3.09 ^a	21.42 $\pm$ 3.53 ^b	13.12 $\pm$ 0.64 ^a
	III	4.88 $\pm$ 1.28 ^a	82.9 $\pm$ 5.06 ^b	27.73 $\pm$ 1.65 ^b	10.59 $\pm$ 3.36 ^a	7.64 $\pm$ 1.25 ^b	3.78 $\pm$ 0.61 ^a	80.88 $\pm$ 19.52 ^a	16.06 $\pm$ 2.26 ^a	20.52 $\pm$ 2.84 ^b
	IV	16.32 $\pm$ 4.95 ^b	59.78 $\pm$ 4.43 ^c	25.39 $\pm$ 3.63 ^b	39.06 $\pm$ 11.52 ^b	16.53 $\pm$ 3.14 ^a	11.91 $\pm$ 5.51 ^b	94.26 $\pm$ 7.36 ^a	18.57 $\pm$ 2.59 ^{ab}	17.93 $\pm$ 2.84 ^b
p-value		0.007	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.005	0.006	0.4	0.02	<0.0001
IL-6 (pg/mL)	I	3242.72 $\pm$ 351.61 ^a	3208.46 $\pm$ 131.08 ^a	82.92 $\pm$ 9.49 ^a	109.72 $\pm$ 32.29 ^{ab}	191.17 $\pm$ 51.99 ^a	1445.19 $\pm$ 148.66 ^a	3017.96 $\pm$ 67.14 ^{ab}	287.42 $\pm$ 99.84 ^{ab}	381.31 $\pm$ 48.05 ^a
	II	2350.71 $\pm$ 619.27 ^b	3511.36 $\pm$ 207.98 ^b	88.04 $\pm$ 41.9 ^a	84.53 $\pm$ 29.96 ^{ab}	1359.08 $\pm$ 509.22 ^b	609.33 $\pm$ 68.94 ^a	3250.99 $\pm$ 20.21 ^a	202.07 $\pm$ 37.59 ^{ab}	495.09 $\pm$ 138.79 ^{ac}
	III	2086.04 $\pm$ 311.78 ^b	1137.33 $\pm$ 78.39 ^c	137.22 $\pm$ 20.5 ^b	49.36 $\pm$ 17.6 ^a	907.82 $\pm$ 142.4 ^b	1782.39 $\pm$ 115.68 ^a	2750.83 $\pm$ 361.18 ^b	179.94 $\pm$ 16.28 ^a	717.53 $\pm$ 226.55 ^b
	IV	3614.73 $\pm$ 141.05 ^a	3038.35 $\pm$ 85.13 ^a	28.3 $\pm$ 11.51 ^c	132.75 $\pm$ 49.16 ^b	1168.01 $\pm$ 77.46 ^b	2185.35 $\pm$ 55.85 ^a	2930.5 $\pm$ 98.68 ^{ab}	311.87 $\pm$ 94.4 ^b	391.19 $\pm$ 68.08 ^c
p-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.007	<0.0001	0.5	0.004	0.02	0.003
IL-8 (pg/mL)	I	1718.19 $\pm$ 393.91 ^a	769.49 $\pm$ 211.75 ^a	132.34 $\pm$ 8.54 ^a	88.67 $\pm$ 5.21 ^a	80.33 $\pm$ 16.98 ^a	358.21 $\pm$ 110.42 ^a	1588.46 $\pm$ 47.26 ^a	182.81 $\pm$ 78.53 ^{ab}	145.81 $\pm$ 11.41 ^a
	II	883.18 $\pm$ 518.05 ^b	1842.43 $\pm$ 63.01 ^b	85.21 $\pm$ 12.78 ^b	64.74 $\pm$ 6.25 ^a	118.31 $\pm$ 61.29 ^a	156.92 $\pm$ 90.15 ^b	1466.75 $\pm$ 204.39 ^a	219.34 $\pm$ 42.69 ^a	209.39 $\pm$ 33.31 ^c
	III	229.44 $\pm$ 119.08 ^b	613.47 $\pm$ 78.47 ^a	115.28 $\pm$ 7.68 ^a	71.68 $\pm$ 19.79 ^a	122.4 $\pm$ 66.74 ^a	54.93 $\pm$ 18.1 ^b	2550.22 $\pm$ 288.76 ^b	129.79 $\pm$ 27.65 ^b	256.97 $\pm$ 25.7 ^{bc}
	IV	2105 $\pm$ 472.02 ^a	1348.01 $\pm$ 95.62 ^c	151.93 $\pm$ 16.45 ^a	82.29 $\pm$ 26.21 ^a	257.79 $\pm$ 5.08 ^b	684.77 $\pm$ 55.87 ^c	1403.33 $\pm$ 62.81 ^a	195.29 $\pm$ 19.32 ^{ab}	286.45 $\pm$ 42.94 ^b
p-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.14	0.003	0.003	0.008	0.02	<0.0001

(Continued on the following page)

TABLE 3 (Continued) Comparison of levels of selected cytokines determined in chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$. DOH, on the day of hatch.

Cytokine	Group	DOH					7 days			
		Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine
IL-10 (pg/mL)	I	1521.42 $\pm$ 546.46 ^a	7407.56 $\pm$ 176.91 ^a	110.7 $\pm$ 54.99 ^a	67.84 $\pm$ 17.08 ^a	832.22 $\pm$ 357.25 ^a	145.34 $\pm$ 85.59 ^a	7046.02 $\pm$ 667.56 ^{ab}	853.59 $\pm$ 444.08 ^{ab}	1242.18 $\pm$ 356.25 ^a
	II	1386.39 $\pm$ 680.52 ^{ab}	7483.41 $\pm$ 289.48 ^a	217.88 $\pm$ 70.55 ^{ab}	96.96 $\pm$ 21.9 ^{ab}	975.73 $\pm$ 534.26 ^a	75.2 $\pm$ 7.79 ^a	7435.1 $\pm$ 320.29 ^a	1083.95 $\pm$ 525.65 ^{ab}	1752.28 $\pm$ 57.94 ^{ab}
	III	516.19 $\pm$ 208.23 ^b	4586.4 $\pm$ 134.03 ^b	424.24 $\pm$ 157.14 ^b	129.41 $\pm$ 29.9 ^b	463.41 $\pm$ 36.41 ^a	121.26 $\pm$ 97.74 ^a	6650.28 $\pm$ 255.04 ^b	627.9 $\pm$ 54.88 ^a	2468.45 $\pm$ 531.25 ^b
	IV	1786.3 $\pm$ 571.19 ^a	3504.83 $\pm$ 2327.4 ^b	55.45 $\pm$ 24.65 ^a	402.92 $\pm$ 49.79 ^c	1197.24 $\pm$ 71.54 ^a	215.9 $\pm$ 123.76 ^a	7115.58 $\pm$ 185.92 ^{ab}	1605.8 $\pm$ 392.85 ^b	1266.58 $\pm$ 129.41 ^a
p-value		0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1	0.7	0.02	0.03	0.007
IL-12 (ng/mL)	I	94.09 $\pm$ 4.73 ^a	274.74 $\pm$ 40.19 ^a	47.12 $\pm$ 3.3 ^a	56.93 $\pm$ 6.55 ^a	73.62 $\pm$ 6.21 ^{ac}	82.31 $\pm$ 3.89 ^a	132.85 $\pm$ 9.64 ^a	67.04 $\pm$ 5.29 ^a	48.15 $\pm$ 6.33 ^a
	II	82.47 $\pm$ 3.9 ^b	168.93 $\pm$ 22.37 ^b	56.54 $\pm$ 3.76 ^b	49.26 $\pm$ 1.56 ^b	82.84 $\pm$ 7.99 ^c	72.63 $\pm$ 7.43 ^a	190.88 $\pm$ 4.78 ^b	65.21 $\pm$ 1.74 ^a	71.27 $\pm$ 0.76 ^b
	III	83.93 $\pm$ 1.51 ^{ab}	256.85 $\pm$ 28.48 ^a	61.74 $\pm$ 2.1 ^b	49.72 $\pm$ 3.35 ^b	62.51 $\pm$ 1.11 ^b	90.99 $\pm$ 3.27 ^{ab}	189.13 $\pm$ 24.03 ^b	82.5 $\pm$ 1.34 ^b	83.46 $\pm$ 3.15 ^c
	IV	90.93 $\pm$ 12.02 ^{ab}	138.62 $\pm$ 16.99 ^b	70.8 $\pm$ 7.25 ^c	73.21 $\pm$ 2.66 ^c	72.23 $\pm$ 2.51 ^a	95.66 $\pm$ 10.11 ^b	180.46 $\pm$ 19.34 ^b	80.72 $\pm$ 7.37 ^b	88.05 $\pm$ 3.43 ^c
p-value		0.03	<0.0001	<0.0001	0.006	0.02	<0.0001	0.007	<0.0001	<0.0001
TNF- α (ng/mL)	I	56.73 $\pm$ 4.9 ^a	550.2 $\pm$ 106.76 ^a	132.87 $\pm$ 26.7 ^a	66.35 $\pm$ 8.56 ^a	52.41 $\pm$ 10.06 ^a	20.27 $\pm$ 2.09 ^a	204.23 $\pm$ 46.52 ^a	81.56 $\pm$ 30.69 ^a	117.72 $\pm$ 13.49 ^{ab}
	II	30.76 $\pm$ 4.89 ^{ab}	356.34 $\pm$ 23.12 ^{ab}	61.54 $\pm$ 11.5 ^b	123.5 $\pm$ 16.06 ^a	60.14 $\pm$ 7.14 ^{ab}	6.76 $\pm$ 0.89 ^b	253.08 $\pm$ 44.32 ^{abc}	102.13 $\pm$ 4.3 ^a	101.48 $\pm$ 43.84 ^a
	III	19.69 $\pm$ 3.43 ^b	319.96 $\pm$ 29.16 ^b	72.67 $\pm$ 9.29 ^{bc}	85.08 $\pm$ 8.1 ^a	41.7 $\pm$ 14.9 ^b	16.32 $\pm$ 1.73 ^{ab}	343.97 $\pm$ 22.48 ^{ac}	106.55 $\pm$ 20.18 ^a	181.5 $\pm$ 16.24 ^b
	IV	75.13 $\pm$ 10.89 ^{ac}	259.55 $\pm$ 79.18 ^b	128.65 $\pm$ 24.72 ^{ac}	195.68 $\pm$ 19.1 ^a	93.84 $\pm$ 39.19 ^a	72.37 $\pm$ 10.56 ^c	371.58 $\pm$ 69.12 ^b	98.33 $\pm$ 36.45 ^a	110.35 $\pm$ 45.11 ^{ab}
p-value		0.004	<0.0001	<0.0001	0.7	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.8	0.002
IFN- γ (pg/mL)	I	2122.28 $\pm$ 620.21 ^{ab}	2551.24 $\pm$ 709.07 ^a	144.67 $\pm$ 8.49 ^a	103.84 $\pm$ 38.32 ^{ab}	64.83 $\pm$ 15.23 ^a	25.26 $\pm$ 6.08 ^{ab}	2429.4 $\pm$ 280.1 ^a	467.7 $\pm$ 111.08 ^a	509.9 $\pm$ 65.11 ^a
	II	1293.09 $\pm$ 842.93 ^{ab}	4183.56 $\pm$ 232.94 ^b	88.73 $\pm$ 13.73 ^{ab}	37.84 $\pm$ 10.17 ^a	226.25 $\pm$ 55.48 ^b	11.82 $\pm$ 1.57 ^a	2841.97 $\pm$ 58.9 ^{ab}	424.03 $\pm$ 7.75 ^a	381.61 $\pm$ 72.66 ^a
	III	367.73 $\pm$ 191.37 ^b	1470.88 $\pm$ 207.9 ^c	41.11 $\pm$ 4.2 ^b	96.11 $\pm$ 29.73 ^{ab}	89.28 $\pm$ 17.89 ^{ab}	92.14 $\pm$ 64.37 ^{bc}	2280.03 $\pm$ 213.1 ^c	376.04 $\pm$ 23.69 ^{ab}	519.96 $\pm$ 163.62 ^a
	IV	2591.68 $\pm$ 775.47 ^a	2728.03 $\pm$ 510.74 ^a	141.4 $\pm$ 19.49 ^a	195.15 $\pm$ 37.25 ^b	285.59 $\pm$ 77.69 ^b	304.65 $\pm$ 43.61 ^{bc}	3305.02 $\pm$ 111.75 ^{ab}	282.48 $\pm$ 74.27 ^b	835.91 $\pm$ 84 ^b
p-value		0.002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.003	0.004

(Continued on the following page)

TABLE 3 (Continued) Comparison of levels of selected cytokines determined in chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$. DOH, on the day of hatch.

Cytokine	Group	DOH					7 days			
		Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine
TGF- β 1 (pg/mL)	I	9.63 $\pm$ 1.50 ^a	45.73 $\pm$ 3.07 ^a	6.5 $\pm$ 0.81 ^a	6.77 $\pm$ 0.56 ^a	8.15 $\pm$ 0.33 ^a	8.60 $\pm$ 0.74 ^a	29.39 $\pm$ 0.62 ^a	10.55 $\pm$ 0.65 ^a	9.15 $\pm$ 2.08 ^a
	II	9.05 $\pm$ 1.13 ^a	31.12 $\pm$ 1.61 ^b	8.18 $\pm$ 0.66 ^b	6.84 $\pm$ 0.38 ^a	10.96 $\pm$ 2.03 ^b	7.57 $\pm$ 0.76 ^a	37.53 $\pm$ 0.4 ^b	10.99 $\pm$ 0.4 ^a	11.51 $\pm$ 0.63 ^b
	III	9.14 $\pm$ 0.43 ^a	43.14 $\pm$ 1.82 ^a	8.75 $\pm$ 0.18 ^b	7.83 $\pm$ 0.24 ^b	8.59 $\pm$ 1.37 ^a	7.85 $\pm$ 0.53 ^{ab}	31.26 $\pm$ 2.16 ^a	10.29 $\pm$ 0.59 ^a	13.45 $\pm$ 0.63 ^{bc}
	IV	9.09 $\pm$ 0.79 ^a	27.66 $\pm$ 2.56 ^b	9.27 $\pm$ 0.73 ^b	12.61 $\pm$ 0.29 ^c	10.05 $\pm$ 0.36 ^{ab}	10.11 $\pm$ 1.09 ^b	30.34 $\pm$ 2.32 ^a	11.41 $\pm$ 2.17 ^a	10.64 $\pm$ 0.11 ^{ab}
p-value		0.08	<0.0001	0.003	<0.0001	0.02	0.001	0.004	0.7	0.005

a, b, c – statistical differences.

IV was statistically significantly higher than in groups I and II. On DOH, the MBL content in the large intestines of birds in group IV was statistically significantly higher than in group I. At 7 days, the content of MBL in the large intestine was statistically significantly higher in group IV than in group I. The content of MBL in the yolk sac in group I was statistically significantly lower than in groups II and III (Table 4).

3.3 Concentrations of immunoglobulins in the serum and tissues of chickens

On DOH, the concentration of IgA in the serum of chickens was statistically significantly higher in group IV than in the other groups. At 7 days, the serum IgA concentration in the group IV chickens was statistically significantly higher than in group I. On DOH, the IgA concentrations in the livers of chickens in groups II and IV were statistically significantly higher than in groups I and III. At 7 days, the IgA concentration in the livers of chickens from group II was statistically significantly higher than in the other groups. On DOH, a statistically significantly lower concentration of IgA was observed in the small intestines of birds from group II than in the other groups. At 7 days, the IgA concentration in the small intestine was statistically significantly lower in group IV than in the other groups. On DOH, the concentration of IgA in the large intestines of chickens from group II was statistically significantly higher than the other groups. At 7 days, the concentrations of IgA in the large intestines of birds in all supplemented groups were statistically significantly higher than in group I. Statistically significantly higher IgA concentrations were noted in the yolk sacs of birds in groups II and III compared to groups I and IV (Table 5).

On DOH, the serum IgY concentration of birds in group III was statistically significantly higher than the other groups. After 7 days, the serum IgY concentration in group I was statistically significantly higher than the other groups. On DOH, statistically significantly higher IgY concentrations were determined in the livers of chickens from groups III and IV compared to groups I and III. At 7 days,

the IgY concentration in the livers of chickens from group I was statistically significantly lower than in the supplemented groups. On DOH, the IgY concentrations in the small intestines of birds from groups III and IV were statistically significantly higher than in groups I and II. After 7 days, the concentration of IgY in the small intestine in group IV was statistically significantly higher than in the other groups. On DOH, the IgY concentration in the large intestines of chickens from group III was statistically significantly lower than in the other groups. After 7 days, the IgY concentration in the large intestine of group III was statistically significantly lower than the other groups. A statistically significantly lower concentration of IgY was noted in the yolk sacs of birds from group II compared to groups I and III (Table 5).

On DOH, IgM concentrations in the serum of chickens from groups I and IV were statistically significantly lower than groups II and III. At 7 days, the IgM concentration in the serum of chickens from group III was statistically significantly lower than in the other groups. At 7 days, the IgM concentration in the livers of group II was statistically significantly lower than in the other groups. On DOH, the IgM concentration in the small intestines of birds from group I was statistically significantly lower than in groups II, III and IV. At 7 days, the IgM concentrations in the small intestines of chickens in all supplemented groups (II, III, and IV) were statistically significantly lower than in group I. In the large intestines analyzed on DOH, the IgM concentration in group III was statistically significantly lower than in the other groups. At 7 days, the IgM concentration in the large intestines of birds from group II was statistically significantly higher than in groups I, III, and IV. A statistically significantly lower IgM concentration was noted in the yolk sacs of birds from group IV compared to group I (Table 5).

3.4 IgA, IgM, and IgY mRNA expression ratios in the ileum

IgA, IgM, and IgY mRNA expression ratios in the ileum were statistically significantly higher at 7 days than on DOH. At 7 days,

TABLE 4 Comparison of levels of selected acute-phase proteins determined in chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation (±SD) at $p \leq 0.05$. DOH₁, on the day of hatch.

Protein	Group	DOH				7 days				
		Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine
α-1-AGP (µg/mL)	I	206.92 ± 25.30 ^a	4443.39 ± 149.62 ^a	13,055.65 ± 868.14 ^a	13,350.77 ± 356.74 ^a	3196.03 ± 669.65 ^a	404.92 ± 54.69 ^a	3246.75 ± 78.67 ^{ac}	1720.46 ± 79.65 ^{ac}	2310.75 ± 248.44 ^{ab}
	II	307.83 ± 63.54 ^{ab}	2458.96 ± 190.01 ^b	8686.51 ± 3022.75 ^{ab}	10,645.33 ± 3165.23 ^{ab}	4116.11 ± 676.09 ^{ab}	610.70 ± 36.79 ^{ab}	3901.98 ± 44.66 ^b	1560.91 ± 90.31 ^a	2613.26 ± 151.10 ^a
	III	312.36 ± 127.36 ^{ab}	4280.73 ± 72.77 ^a	5158.68 ± 146.31 ^b	13,732.40 ± 172.87 ^a	4924.85 ± 606.63 ^b	750.03 ± 49.48 ^b	3552.5 ± 165.76 ^{ab}	1011.2 ± 169.75 ^b	2504.91 ± 496.84 ^a
	IV	615.99 ± 343.06 ^b	3763.94 ± 487.43 ^{bc}	12,255.15 ± 970.89 ^a	4481.64 ± 222.95 ^b	4904.53 ± 615.75 ^b	382.1 ± 136.81 ^a	2209.11 ± 136.56 ^c	2356.34 ± 121.51 ^c	1552.85 ± 242.09 ^b
Haptoglobin (ng/mL)	p-value	0.02	<0.0001	0.001	0.002	0.003	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0015
	I	78.02 ± 14.46 ^a	85.44 ± 1.39 ^a	15.69 ± 2.58 ^a	37.25 ± 6.95 ^{ac}	77.55 ± 6.78 ^a	133.72 ± 4.78 ^a	99.81 ± 12.68 ^{ab}	78.20 ± 2.12 ^{ab}	56.74 ± 12.79 ^{ab}
	II	85.27 ± 10.21 ^a	106.67 ± 23.22 ^{ab}	65.22 ± 14.82 ^{bc}	46.18 ± 2.13 ^a	68.93 ± 7.63 ^a	133.83 ± 11.05 ^a	96.23 ± 8.24 ^{ab}	73.38 ± 7.46 ^a	46.39 ± 6.59 ^a
	III	84.97 ± 35.23 ^a	111.16 ± 4.90 ^b	23.34 ± 4.09 ^a	16.34 ± 5.70 ^c	72.20 ± 6.69 ^a	120.03 ± 13.02 ^a	86.13 ± 2.99 ^a	96.02 ± 6.23 ^b	80.27 ± 2.15 ^b
Ceruloplasmin (ng/mL)	IV	88.49 ± 25.96 ^a	102.21 ± 0.87 ^{ab}	32.77 ± 1.87 ^{ac}	56.17 ± 3.50 ^b	71.79 ± 6.96 ^a	130.02 ± 4.15 ^a	122.14 ± 1.24 ^b	63.03 ± 5.85 ^a	58.20 ± 2.41 ^{ab}
	p-value	0.7	0.0015	<0.0001	<0.0001	0.3	0.15	0.001	<0.0001	0.001
	I	354.63 ± 133.94 ^a	1284.45 ± 76.66 ^a	2789.06 ± 331.78 ^a	2674.71 ± 90.46 ^a	580.61 ± 83.89 ^a	1106.06 ± 145.99 ^a	988.15 ± 84.52 ^a	526.25 ± 39.16 ^a	513.88 ± 53.20 ^a
	II	455.44 ± 188.29 ^b	586.49 ± 10.17 ^b	1954.38 ± 796.85 ^b	2343.74 ± 505.89 ^{ab}	830.51 ± 200.85 ^{ab}	513.18 ± 261.11 ^b	932.31 ± 102.81 ^{ab}	615.84 ± 167.91 ^a	722.19 ± 15.20 ^b
SAA (ng/mL)	III	213.81 ± 21.91 ^c	1162.39 ± 217.08 ^a	1979.6 ± 103.18 ^b	3084.41 ± 68.46 ^a	1469.75 ± 409.79 ^b	108.92 ± 58.65 ^b	953.58 ± 122.37 ^a	487.10 ± 78.90 ^a	758.79 ± 116.73 ^b
	IV	175.45 ± 60 ^c	1113.24 ± 141.88 ^{ab}	2439.14 ± 105.58 ^a	1043.5 ± 287.10 ^b	1180.06 ± 36.27 ^b	1221.14 ± 152.24 ^a	527.24 ± 46.09 ^b	665.54 ± 111.66 ^a	531.02 ± 61.01 ^a
	p-value	0.0014	0.02	0.013	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.004	0.6	0.001
	I	2.74 ± 0.18 ^{ab}	11.19 ± 0.22 ^a	2.51 ± 0.20 ^a	4.77 ± 0.52 ^a	6.08 ± 0.51 ^a	7.55 ± 0.24 ^a	11.13 ± 0.25 ^a	6.92 ± 0.55 ^a	4.75 ± 0.14 ^a
SAA (ng/mL)	II	3.87 ± 0.78 ^{ab}	10.85 ± 0.89 ^a	4.63 ± 0.21 ^b	4.42 ± 0.81 ^a	4.78 ± 1.34 ^b	7.25 ± 0.46 ^a	11.17 ± 0.16 ^a	6.99 ± 0.32 ^a	5.48 ± 0.26 ^b
	III	4.40 ± 1.93 ^a	10.96 ± 0.04 ^a	3.15 ± 0.34 ^b	1.86 ± 0.99 ^b	8.61 ± 1.14 ^c	5.03 ± 0.82 ^b	7.72 ± 2.17 ^b	6.99 ± 0.36 ^a	4.77 ± 0.47 ^a
	IV	2.13 ± 0.29 ^b	11.64 ± 0.39 ^a	4.24 ± 0.5 ^c	3.78 ± 1.02 ^a	4.06 ± 0.48 ^b	7.17 ± 0.53 ^a	11.27 ± 0.19 ^a	7.81 ± 0.15 ^b	8.19 ± 0.55 ^c

(Continued on the following page)

TABLE 4 (Continued) Comparison of levels of selected acute-phase proteins determined in chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$. DOH, on the day of hatch.

Protein	Group	DOH					7 days			
		Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine
MBL (ng/mL)	p-value	0.002	0.5	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.003	0.008	0.01	0.006
	I	23.09 ± 4.96 ^{ab}	59.06 ± 4.46 ^a	2.95 ± 0.56 ^a	2.31 ± 0.35 ^a	4.60 ± 0.77 ^a	13.00 ± 2.48 ^a	130.59 ± 30.64 ^{ab}	5.34 ± 2.24 ^a	6.91 ± 30 ^a
	II	16.59 ± 3.56 ^a	214.17 ± 6.30 ^b	2.96 ± 0.43 ^a	2.77 ± 0.54 ^{ab}	26.54 ± 12.40 ^b	11.01 ± 4.72 ^{ab}	147.52 ± 3.07 ^{ab}	4.83 ± 0.23 ^a	7.45 ± 0.26 ^{ab}
	III	18.03 ± 7.98 ^{ab}	76.97 ± 25.81 ^a	3.45 ± 0.26 ^{ab}	3.29 ± 0.25 ^{ab}	11.57 ± 0.71 ^b	9.96 ± 0.77 ^b	88.81 ± 38.57 ^a	6.75 ± 1.44 ^a	12.38 ± 1.29 ^{ab}
	IV	25.09 ± 2.13 ^b	189.45 ± 14.29 ^{ab}	3.68 ± 0.33 ^b	3.53 ± 0.22 ^b	9.69 ± 0.96 ^{ab}	26.84 ± 0.57 ^c	152.36 ± 13.42 ^b	4.64 ± 1.01 ^a	13.04 ± 1.15 ^b
p-value		0.02	<0.0001	0.01	0.002	<0.0001	0.002	0.02	0.3	<0.0001

a, b, c – statistical differences.

the IgA mRNA expression ratio was statistically significantly higher in group III than in the other groups, while the IgM mRNA expression ratio was statistically significantly higher in group IV than in group I (Table 6).

3.5 Levels of cytokines in chicken serum and tissues

On DOH, the level of IL-1 β in the serum of chickens from group II was statistically significantly lower than in the other groups. At 7 days post-hatch, the serum level of IL-1 β in chickens from group I was statistically significantly higher than in groups II, III and IV. Both on DOH and at 7 days, the IL-1 β levels in the livers of chickens in group II were statistically significantly higher than in group IV. On DOH, the level of IL-1 β in the small intestine was statistically significantly higher in group III than in the other groups. At 7 days, the IL-1 β level in the small intestines of chickens in group IV was statistically significantly lower than in the other groups. On DOH, the IL-1 β level in the large intestine was statistically significantly higher in group IV than in the other groups. At 7 days, the IL-1 β level in the large intestine was statistically significantly lower in group I than in groups II, III and IV. The IL-1 β level in the yolk sacs of chickens from group II was statistically significantly higher than in the other groups (Table 3).

On DOH, the level of IL-2 in the serum of chickens in group IV was statistically significantly higher than in group III. At 7 days, the serum IL-2 level in group IV was statistically significantly higher than in groups II and III. On DOH, the IL-2 level in the livers of chickens was statistically significantly higher in group I than in any of the supplemented groups. On DOH, the levels of IL-2 in the small intestines of chickens in groups III and IV were statistically significantly higher than in groups I and II. At 7 days, the IL-2 level in the small intestines of birds from group II was statistically significantly higher than in groups I and III. On DOH, the IL-2 level in the large intestines of chickens was statistically significantly higher in group IV than in the remaining groups (I–III). At 7 days, the IL-2 levels in the large intestines of chickens in groups III and IV were statistically significantly higher than in groups I and II. The IL-2 level in the yolk sacs of chickens from group III was statistically significantly lower than in groups I, II and IV (Table 3).

On DOH, statistically significantly higher levels of IL-6 were determined in the serum of chickens in groups I and IV compared to the remaining groups. On DOH, the IL-6 level in the livers of chickens from group II was statistically significantly higher than in the other groups (I, III, and IV). At 7 days, the level of IL-6 in the livers of chickens from group II was statistically significantly higher than in group III. On DOH, the IL-6 level in the small intestines of chickens from group III was statistically significantly higher than in the remaining groups. At 7 days, the IL-6 level in the small intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in group III. At 7 days, the IL-6 level in the large intestines of chickens from group III was statistically significantly higher than in the other groups. The IL-6 level in the yolk sacs of chickens from group I was statistically significantly lower than in groups II, III, and IV (Table 3).

TABLE 5 Comparison of levels of selected immunoglobulins determined in chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation (±SD) at $p \leq 0.05$. DOH₁ on the day of hatch.

Immunoglobulin	Group	DOH					7 days				
		Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	Yolk sac	Serum	Liver	Small intestine	Large intestine	
IgA (ng/mL)	I	0.39 ± 0.13 ^a	54.24 ± 3.45 ^a	3.99 ± 1.40 ^a	2.08 ± 0.13 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	1.14 ± 0.23 ^a	36.02 ± 5.45 ^a	5.14 ± 0.56 ^a	2.59 ± 0.41 ^a	
	II	0.57 ± 0.21 ^a	76.32 ± 2.65 ^b	1.91 ± 0.06 ^b	5.56 ± 0.74 ^b	0.42 ± 0.01 ^b	2.05 ± 0.74 ^{ab}	51.34 ± 3.41 ^b	5.68 ± 0.42 ^a	4.58 ± 0.35 ^b	
	III	0.47 ± 0.04 ^a	60.24 ± 2.32 ^c	3.80 ± 0.21 ^a	2.22 ± 0.36 ^a	0.48 ± 0.13 ^b	1.91 ± 1.07 ^{ab}	34.57 ± 2.45 ^a	5.70 ± 1.43 ^a	4.15 ± 0.36 ^b	
	IV	1.02 ± 0.33 ^b	77.74 ± 2.38 ^b	4.25 ± 0.50 ^a	3.16 ± 0.38 ^c	0.24 ± 0.09 ^a	2.85 ± 0.37 ^b	41.11 ± 3.15 ^a	4.36 ± 0.19 ^b	6.74 ± 0.25 ^c	
p-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.008	<0.0001	<0.0001	0.005	
IgM (pg/mL)	I	3.18 ± 0.12 ^a	35.30 ± 0.55 ^a	2.18 ± 0.71 ^a	3.21 ± 0.08 ^a	9.55 ± 0.29 ^a	10.34 ± 0.64 ^a	33.77 ± 0.34 ^a	14.68 ± 1.0 ^a	10.13 ± 0.50 ^a	
	II	8.86 ± 0.23 ^b	35.5 ± 0.38 ^a	5.95 ± 2.28 ^b	3.19 ± 0.81 ^a	8.37 ± 1.15 ^{ab}	12.86 ± 0.50 ^a	25.04 ± 5.69 ^b	11.44 ± 0.77 ^{bc}	16.54 ± 3.83 ^b	
	III	4.85 ± 1.62 ^c	35.64 ± 0.29 ^a	5.35 ± 0.24 ^b	1.87 ± 0.62 ^b	8.73 ± 0.25 ^{ab}	4.55 ± 0.77 ^b	35.44 ± 0.19 ^a	11.93 ± 0.77 ^b	10.72 ± 0.79 ^a	
	IV	2.59 ± 0.32 ^a	35.51 ± 0.51 ^a	6.68 ± 0.81 ^b	6.63 ± 0.87 ^c	7.58 ± 1.61 ^b	12.54 ± 3.03 ^a	31.79 ± 0.57 ^a	9.65 ± 1.62 ^c	14.72 ± 2.68 ^a	
p-value		<0.0001	0.7	<0.0001	<0.0001	0.04	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
IgY (pg/mL)	I	7.64 ± 0.21 ^a	89.29 ± 5.50 ^a	4.50 ± 0.94 ^a	22.18 ± 4.60 ^a	262.31 ± 177.90 ^a	13.76 ± 2.09 ^a	54.20 ± 5.29 ^a	5.79 ± 2.66 ^a	6.55 ± 1.84 ^a	
	II	10.86 ± 4.11 ^a	101.35 ± 1.43 ^a	6.60 ± 1.70 ^a	23.68 ± 1.70 ^a	41.28 ± 4.28 ^b	4.94 ± 2.33 ^b	71.77 ± 3.30 ^b	2.81 ± 0.41 ^a	17.40 ± 5.18 ^a	
	III	25.78 ± 9.82 ^b	172.72 ± 12.79 ^b	16.32 ± 3.33 ^b	11.21 ± 0.60 ^b	259.67 ± 121.87 ^a	3.48 ± 0.49 ^b	80.38 ± 3.68 ^c	5.95 ± 1.05 ^a	9.26 ± 1.25 ^b	
	IV	1.78 ± 0.35 ^c	120.52 ± 16.38 ^c	14.72 ± 2.49 ^b	18.26 ± 0.38 ^a	94.38 ± 9.89 ^{ab}	2.40 ± 0.92 ^b	113.16 ± 3.54 ^d	43.3 ± 6.38 ^b	41.14 ± 6.14 ^a	
p-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

a, b, c – statistical differences.

TABLE 6 Comparison of mean mRNA expression ratio values for selected immunoglobulins determined in the ileum of chickens from control (I) and experimental groups (II–IV) using one-way ANOVA. Results are presented as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$. DOH, on the day of hatch.

Group	Ileum mRNA expression ratio					
	DOH			7 days		
	IgA	IgM	IgY	IgA	IgM	IgY
I	1.15 $\pm$ 0.10 ^a	1.20 $\pm$ 0.21 ^a	1.35 $\pm$ 0.19 ^a	1.54 $\pm$ 0.24 ^a	2.20 $\pm$ 0.27 ^a	2.30 $\pm$ 0.27 ^b
II	1.15 $\pm$ 0.13 ^a	1.10 $\pm$ 0.10 ^a	1.15 $\pm$ 0.13 ^a	2.42 $\pm$ 0.42 ^b	2.58 $\pm$ 0.46 ^{ab}	2.72 $\pm$ 1.06 ^b
III	1.12 $\pm$ 0.13 ^a	1.28 $\pm$ 0.24 ^a	1.21 $\pm$ 0.21 ^a	3.20 $\pm$ 0.47 ^c	2.26 $\pm$ 0.31 ^{ab}	3.14 $\pm$ 0.78 ^b
IV	1.10 $\pm$ 0.12 ^a	1.25 $\pm$ 0.10 ^a	1.20 $\pm$ 0.00 ^a	2.28 $\pm$ 0.48 ^b	2.38 $\pm$ 0.49 ^b	3.40 $\pm$ 0.49 ^b
p-value	0.95	0.19	0.2	0.00003	0.039	0.27

a, b, c – statistical differences.

TABLE 7 Chicken growth performance. Results are presented as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$.

Group	Initial body weight	Starter (0–10)			Grower (10–24)			Finisher (24–42)			Total (0–42)		
		BWG	FI	FCR	BWG	FI	FCR	BWG	FI	FCR	BWG	FI	FCR
I	41.28 $\pm$ 2.32 ^a	413 $\pm$ 18.8 ^{ab}	487 $\pm$ 25.3 ^a	1.18 $\pm$ 0.04 ^a	1136 $\pm$ 27.8 ^a	1551 $\pm$ 9.1 ^a	1.366 $\pm$ 0.03 ^a	1342 $\pm$ 126 ^a	2591 $\pm$ 147 ^a	1.93 $\pm$ 0.12	2890 $\pm$ 131 ^a	4629 $\pm$ 154 ^a	1.60 $\pm$ 0.06
II	41.57 $\pm$ 2.13 ^a	401 $\pm$ 15.9 ^b	459 $\pm$ 15.0 ^b	1.14 $\pm$ 0.5 ^b	1052 $\pm$ 25.6 ^b	1463 $\pm$ 28.6 ^c	1.39 $\pm$ 0.02 ^b	1271 $\pm$ 112 ^b	2349 $\pm$ 153 ^b	1.85 $\pm$ 0.16	2724 $\pm$ 140 ^b	4271 $\pm$ 155 ^b	1.57 $\pm$ 0.07
III	41.79 $\pm$ 2.33 ^a	424 $\pm$ 19.0 ^a	471 $\pm$ 29.1 ^{ab}	1.11 $\pm$ 0.05 ^c	1120 $\pm$ 31.5 ^a	1518 $\pm$ 23.2 ^b	1.36 $\pm$ 0.02 ^a	1338 $\pm$ 160 ^a	2503 $\pm$ 342 ^{ab}	1.88 $\pm$ 0.25	2881 $\pm$ 151 ^a	4492 $\pm$ 325 ^a	1.56 $\pm$ 0.12
IV	41.12 $\pm$ 2.17 ^a	416 $\pm$ 18.9 ^{ab}	484 $\pm$ 23.2 ^a	1.17 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1121 $\pm$ 35.4 ^a	1539 $\pm$ 48.3 ^{ab}	1.373 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1354 $\pm$ 67.4 ^a	2498 $\pm$ 150 ^{ab}	1.85 $\pm$ 0.11	2891 $\pm$ 82 ^a	4522 $\pm$ 181 ^a	1.56 $\pm$ 0.05
P-value	0.7433	0.0465	0.013	0.0005	<0.0001	<0.0001	0.0423	0.0494	0.0277	0.3313	<0.0001	0.0005	0.3463

a, b, c, statistical differences; BWG, body weight gain; FI, feed intake; FCR, feed conversion ratio.

TABLE 8 Results of one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for relative weight of lymphoid organs (grams–g) in chickens^a. Results are expressed as means and standard deviation ($\pm$ SD) at $p \leq 0.05$.

Organ (g)	Group									
	I	II	III	IV	p-value	I	II	III	IV	p-value
	DOH					7 days				
Bursa of Fabricius	0.09 $\pm$ 0.01 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.09 $\pm$ 0.01 ^a	0.09 $\pm$ 0.02 ^a	0.8	0.17 $\pm$ 0.02 ^a	0.18 $\pm$ 0.03 ^a	0.19 $\pm$ 0.02 ^a	0.18 $\pm$ 0.01 ^a	0.7
Thymus	0.04 $\pm$ 0.01 ^a	0.04 $\pm$ 0.01 ^a	0.05 $\pm$ 0.02 ^a	0.04 $\pm$ 0.01 ^a	0.5	0.37 $\pm$ 0.06 ^a	0.39 $\pm$ 0.08 ^a	0.42 $\pm$ 0.04 ^a	0.39 $\pm$ 0.05 ^a	0.6
Spleen	0.02 $\pm$ 0.01 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.1	0.05 $\pm$ 0.02 ^a	0.09 $\pm$ 0.01 ^b	0.07 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.06 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.02

^aValues (g/100 g of body weight) are means from three birds per replicate (30 samples in total) from each group. Lowercase letters (a, b) indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between groups. DOH, on the day of hatch.

On DOH, the level of IL-8 in the serum of chickens from group IV was statistically significantly higher than in groups II and III. At 7 days, the serum IL-8 level in group IV was statistically significantly higher than in the other groups. On DOH, the IL-8 level in the livers of group II was statistically significantly higher than in the other groups. At 7 days, the IL-8 level in the livers of group III chickens was statistically significantly higher than in the other groups. On DOH, the IL-8 level in the small intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in group II. At 7 days, the IL-8 level in the small intestines of chickens from group II was statistically significantly higher than in group III. At 7 days, the IL-8 level in the large intestines of chickens from group I was statistically significantly lower than in groups II, III, and IV. The IL-8 level in the yolk sac was statistically significantly higher in group IV than in the other groups (Table 3).

On DOH, the level of IL-10 in the serum of chickens from group III was statistically significantly lower than in groups I and IV. On DOH, IL-10 levels in the livers of chickens from groups III and IV were statistically significantly lower than in groups I and II. At 7 days, the IL-10 level in the livers of chickens from group III was statistically significantly lower than in group II. On DOH, the IL-10 level in the small intestines of chickens from group III was statistically significantly higher than in groups I and IV. At 7 days, the IL-10 level in the small intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in group III. On DOH, the IL-10 level in the large intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in the remaining groups. At 7 days, the IL-10 level in the large intestines of chickens from group III was statistically significantly higher than in groups I and IV (Table 3).

On DOH, the level of IL-12 in the serum of chickens from group I was statistically significantly higher than in group II. At 7 days, the serum IL-12 level in group IV was statistically significantly higher than in groups I and II. On DOH, the IL-12 levels in the livers of chickens from groups I and III were statistically significantly higher than in groups II and IV. At 7 days, the IL-12 level in the livers of chickens from group I was statistically significantly lower than in the supplemented groups (II, III, and IV). On DOH, the IL-12 level in the small intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in the other groups. At 7 days post-hatch, the IL-12 levels in the small intestines of chickens from groups III and IV were statistically significantly higher than in groups I and II. On DOH, the IL-12 level in the large intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in the other groups. At 7 days, the IL-12 levels in the large intestines of chickens from groups III and IV were statistically significantly higher than in groups I and II. The IL-12 level in the yolk sacs of chickens from group II was statistically significantly higher than in groups III and IV (Table 3).

On DOH, the level of TNF- α in the serum of chickens from group IV was statistically significantly higher than in group III. At 7 days post-hatch, the serum TNF- α level in group IV was statistically significantly higher than in the other groups. On DOH, its level in the liver of chickens from group I was statistically significantly higher than in groups III and IV. At 7 days, the TNF- α level in the liver was statistically significantly higher in group IV than in the other groups. On DOH, the TNF- α level in the small intestines of chickens from group I was statistically significantly higher than

in groups II and III. At 7 days post-hatch, the TNF- α level in the large intestines of chickens from group III was statistically significantly higher than in group II. In turn, its level in the yolk sacs of chickens from group III was statistically significantly lower than in groups I and IV (Table 3).

On DOH, the level of IFN- γ in the serum of chickens from group IV was statistically significantly higher than in group III. At 7 days, the serum level of IFN- γ in group II was statistically significantly lower than in groups III and IV. On DOH, the IFN- γ level of the livers of chickens from group II was statistically significantly higher than in groups I, III, and IV. At 7 days, its level in group III was statistically significantly lower than in the other groups. On DOH, the IFN- γ level in the small intestines of birds from group III was statistically significantly lower than in groups I and IV. At 7 days, the IFN- γ level in the small intestines of chickens from group IV was statistically significantly lower than in groups I and II. On DOH, the IFN- γ level in the large intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in group II. At 7 days, the IFN- γ level in the large intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in the other groups. The IFN- γ level in the yolk sacs of chickens from group I was statistically significantly lower than in groups II, III, and IV (Table 3).

At 7 days, the serum level of TGF- β 1 in group IV was statistically significantly higher than in groups I and II. On DOH, TGF- β 1 levels in the livers of chickens from groups II and IV were statistically significantly lower than in groups I and III. At 7 days, statistically significantly higher levels of TGF- β 1 were noted in the livers of chickens from group II compared to the remaining groups. On DOH, the TGF- β 1 level in the small intestines of chickens in group I was statistically significantly lower than in the supplemented groups. On DOH, the TGF- β 1 level in the large intestines of chickens from group IV was statistically significantly higher than in the other groups. At 7 days, the level of TGF- β 1 in the large intestines of chickens from group I was statistically significantly lower than in groups II and III. The TGF- β 1 level in the yolk sacs of chickens from group II was statistically significantly higher than in groups I and III (Table 3).

3.6 The relative weight of lymphatic organs in chickens

At 7 days, the relative weight of the spleens in group I was statistically significantly lower than in group II but did not differ statistically significantly from the other groups (III and IV) (Table 8).

4 Discussion

One of the major acute-phase proteins in poultry used as a biomarker of inflammation is SAA (Caliendo et al., 2013; Rhim et al., 2024). Its immunomodulatory activity plays an important role in homeostasis, contributing to the downregulation of inflammation (Urieli-Shoval et al., 2000). Chamanza et al. (1999) and Sevimli et al. (2008) showed that the SAA level increased due to the effect of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α on the body. Our study showed an increased SAA level in the small

intestine tissue on DOH in the groups of birds receiving a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. It is likely that changes in the composition of the microbiota cause the synthesis and release of SAA and the modulation of the local immune response in the intestine. It should be noted that these changes were not observed 7 days post-hatch. Moreover, at that time there were no changes in the SAA level in the serum and liver; hence, it is likely that the response was limited to tissues, without the development of generalized inflammation. However, the higher SAA concentration observed at 7 days post-hatch in the small and large intestines of birds receiving Zn *in ovo* in the form of glycine chelate may indicate that *in ovo* administration of zinc compounds may induce a stress response, such as due to the irritant effect of zinc on the intestinal epithelium. This leads to a local disturbance of homeostasis, limited to the intestinal tissue and manifested as an increased level not only of SAA (Alsemgeest et al., 1995) but of other proteins as well, such as haptoglobin, which was noted at high concentrations at 7 days post-hatch in chickens receiving Zn and the multi-strain probiotic *in ovo*.

It is worth noting the absence of differences between the control and experimental groups in the haptoglobin (Hp) concentration in the yolk sac, serum, and liver on DOH and at 7 days post-hatch. Increased Hp levels are usually noted during infections, inflammation, or tissue damage—for example, in infectious bronchitis virus (IBV), infectious bursal disease (IBD), retention disorders, and yolk sac infections (Nazifi et al., 2009; Nazifi et al., 2011; Mosleh et al., 2012). The absence of changes in Hp levels in the serum and yolk sac in our experiment allows us to exclude bacterial infections, systemic inflammations, or immunosuppressive diseases, whereas the changes in other APPs (SAA and AGP) should be ascribed to the effects of the compounds administered *in ovo*. The increase in the Hp concentration at 7 days post-hatch in the small and large intestines of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate may indicate successive multiplication of the gastrointestinal tract by the bacteria contained in the probiotic and environmental microbes stimulating local immune mechanisms. The high Hp concentration in the small intestine on DOH in the group of birds receiving the multi-strain probiotic indicates the implantation of the intestinal tissue by probiotic bacteria, which presumably stimulates immunocompetent cells of the GALT (gut-associated lymphoid tissue) system to synthesize Hp locally. In addition, rapidly dividing enterocytes together with probiotic bacteria stimulate metabolic processes in the intestines and the synthesis of proteins.

One of the most important APPs produced in the liver and secreted into the bloodstream is mannose-binding lectin (MBL) (Idowu et al., 2021). This protein, which is one of the collectins, plays an important role in non-specific immune response (Takahashi et al., 2006). In the present study, an increase in its concentration was noted on DOH in the yolk sacs in the group of birds receiving the multi-strain probiotic *in ovo*. Such a result may confirm the activation of the non-specific immune response already at the embryonic stage. In the liver, increased concentrations of this protein were shown in both the group receiving the multi-strain probiotic (group II) and the group administered the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate (group IV). These results demonstrate that probiotic bacteria administered *in ovo*, by colonizing the gastrointestinal tract of the developing

bird before hatching, activate immune mechanisms which stimulate pathogen recognition processes and activate the specific immune response. Taking into account the results published so far, we can hypothesize that the preparations administered *in ovo* cause no imbalance in oxidative and antioxidant processes and that there are no ongoing inflammatory processes associated with oxidative stress, as evidenced by the low MBL levels in serum and tissues 7 days post hatching (Ciszewski et al., 2023b). It is notable that at 7 days post-hatch, the MBL concentration was also statistically significantly higher in the serum and large intestines of the birds receiving Zn-Gly chelate *in ovo* and in the large intestines of the birds administered the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. This suggests that *in ovo* administration of Zn-Gly chelate can lead to a temporary stress response in newly hatched chicks due to the effect of highly bioavailable, easily absorbed zinc in organic form, accumulating in the tissues and organs. On the other hand, once accumulated in tissues, zinc may be involved in the temporary intensification of the immune response. It should also be emphasized that *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate modulates the acute-phase response, particularly in the gastrointestinal tract. The changes observed are local and primarily affect the small intestine and yolk sac. The changes in SAA, Hp, and MBL concentrations observed in these tissues are likely transient, indicating that the compounds administered *in ovo* do not induce generalized inflammation or oxidative stress. At the same time, these data support the hypothesis that probiotics and zinc chelate exert an immunomodulatory effect, influencing the activation of innate immunity at the mucosal level. Another acute-phase protein typical of poultry is α 1-acid glycoprotein (α 1-AGP), synthesized and secreted by hepatocytes. In the present study, no increase in AGP was shown in the liver either on DOH or at 7 days post-hatch. On the contrary, the AGP concentration was lower than in the control group on DOH and at 7 days post-hatch in the birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate, respectively. Thus, we may speculate that the chickens did not suffer from any bacterial, viral, or systemic inflammation, which in natural conditions would lead to increased synthesis of AGP (Adler et al., 2001). The increased serum concentration of AGP in the chickens on DOH in the group receiving Zn-Gly chelate *in ovo* correlates with the increase in the serum levels of cytokines IL-1, IL-6, and TNF- α . These cytokines, IL-6 in particular, are considered to be factors that stimulate AGP synthesis in the liver and extrahepatic tissues (Tanaka et al., 2014). However, their concentrations determined in the liver tissue on DOH, except for IL-1, are relatively low. Thus, the temporary increase in the serum AGP level may be due to the redistribution of rapidly absorbed Zn to the tissues of the chicks. Taking into account the levels of other APPs (SAA, Hp, and Cp), we can hypothesize that the *in ovo* administration of non-specific immunogens, such as the non-pathogenic microbes contained in a multi-strain probiotic or highly bioavailable Zn in organic form, affects metabolic processes in the liver and immunocompetent cells regulating the strength of the immune response to exposure to them. This temporary stimulation is indicative of the anti-inflammatory and immunoregulatory effects of these proteins.

We also obtained interesting results regarding the concentrations of acute-phase proteins in the yolk sac on DOH. The concentrations of SAA, AGP, and Cp were highest in the group

of the chickens receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*. In the case of MBL, the highest concentration was noted in the group administered the multi-strain probiotic. The exact biological functions of these proteins in chickens and in developing embryos are not fully understood, despite the fact that their multi-faceted effects on the body have already been described (Gruys et al., 2005). The concentrations of acute-phase proteins in chickens in the period immediately after hatching, particularly in the yolk sac, have not been previously studied. APPs, such as AGP and SAA, may be produced locally in the oviduct or derive from the serum of laying hens and then enter the egg, including the yolk, which is the site of 16%–18% of proteins (Yadgary et al., 2010) that play an important role in the embryonic development of chicks. Approximately 119 proteins have thus far been identified in chicken egg yolks using 1-D SDS-PAGE, LC-MS/MS, and MS. The most abundant of these include serum albumin, vitellogenin (VTG) cleavage products, apovitellenins, immunoglobulin Y (IgY), α -fetoprotein, retinol-binding protein 4, and transthyretin (Zhu et al., 2020; Wu et al., 2022). This group of proteins also includes APPs, such as AGP, SAA, and CP, which in our study were present in high concentrations in the yolk sac immediately after hatching. These proteins can also be synthesized directly by the yolk sac tissues, influencing embryogenesis. It should be noted that APPs are also secreted by cells in which stress responses take place (Speelman et al., 2022). This occurs in the final period of chicken embryo development, in which changes in the lipid metabolism of the yolk—which is a source of energy for hormone synthesis, structural membranes, and cell replication and growth—trigger oxidative stress (Wong and Uni, 2021). These changes may cause a temporary increase in APP synthesis, which in our experiment led to an increase in the concentrations of AGP, SAA, and CP in the yolk sac on DOH. The changes in the levels of these proteins, however, may also have been due to *in ovo* administration of the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate. Their application may lead to changes in the microbiome of the developing chick, early bacterial habitation of the gastrointestinal tract, and increased absorption of highly bioavailable Zn from a chelate complex with glycine. These changes, in turn, result in an enhanced effect of Zn on the cells of the developing organism. This effect may have two different causes: temporary local inflammation resulting from the irritant effect of Zn on cells dividing rapidly during the growth and development of the chick or competition between probiotic and environmental microbes and those transferred to the egg by layer hens. Ceruloplasmin (Patel et al., 2002) is involved in antioxidant and cytoprotective defense, protecting tissues from free radical damage. A high concentration of this protein in the yolk sac is correlated with intensive metabolic processes (Wong and Uni, 2021) and prevents excessive tissue damage to the developing embryo. The Cp levels in the serum and tissues on DOH and at 7 days post-hatch in the experimental groups were comparable to the levels in the control group, or even lower. This indicates that preparations administered *in ovo* are safe for the chicken embryo and do not cause systemic inflammation, which could adversely affect its development. Furthermore, the low Cp levels confirm that the organism is not affected by stimuli inducing an inflammatory response, such as antigens of microbes, parasites, or endo- and exotoxins, which would be associated with inflammation and intensification of the acute-phase response (Georgieva et al., 2010).

Determinations of antibody levels in the serum and tissues of chickens and mRNA expression in the intestines provide interesting data. The results of the study showed that the IgY level in the yolk sac on DOH was equal to or lower than in the control group, which may suggest that the humoral response was not stimulated or that it was suppressed by these compounds. On the other hand, the concentration of this immunoglobulin in the serum and in the liver at 7 days post-hatch was statistically increased in the group administered the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*. This may suggest that IgYs specific to the chicken, present mainly in the serum, are involved in protection against environmental pathogens. Nevertheless, this is not a response to the substances administered *in ovo*, as evidenced by the low serum IgY level at 7 days post-hatch in the experimental groups, indicating that their *in ovo* application is safe. Moreover, in the groups of chicks which received the multi-strain probiotic together with Zn-Gly chelate (group III) or Zn-Gly chelate (group IV), the IgY level determined in the small intestine on DOH was higher than in the other groups. This may suggest that both IgY from the egg yolk and that synthesized by the chick, present in the small intestine, are involved in the control of intestinal pathogens, including those supplied with the microbes constitute the multi-strain probiotic. It seems that the increased IgY level in the groups receiving Zn in the form of highly bioavailable glycine chelate may be due to a stress response, such as that resulting from the irritant effect of zinc on the intestinal epithelium and the compensatory response of the organism, as well as to excessive stimulation of epithelial enterocytes and stimulation of local immune mechanisms, leading to increased B cell proliferation and antibody synthesis induced by the excessive intake of zinc in the chelated form. This observation is confirmed by the high IgY level in the small intestine tissue 7 days post-hatch in the group administered Zn-Gly chelate *in ovo*. It should be borne in mind, however, that the high bioavailability of Zn may induce a local inflammatory process (Bonaventura et al., 2015), and a high IgY concentration is aimed at protecting the intestinal mucosa against invasion by intestinal pathogens. Moreover, no differences were shown in IgY mRNA expression in the intestinal tissue between groups on DOH or at 7 days post-hatch, which confirms that the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate applied *in ovo* do not induce a systemic inflammatory response; their effect is limited to the stimulation of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) system.

In the present study, the IgA level determined on DOH was high in the yolk sac in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic *in ovo*. This increase in IgA may have been due to the transfer of these antibodies from the egg albumen to the yolk and then to the yolk sac or from the embryonic intestine to the yolk sac since day 14 of incubation (Ismiraj et al., 2019). Serum IgA levels on DOH and at 7 days post-hatch were higher in the group of birds receiving Zn-Gly chelate *in ovo*, whereas IgA levels in the liver were increased on DOH in the groups of birds administered the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate and at 7 days post-hatch in the group receiving the multi-strain probiotic. This may be indicative of the stimulation of humoral immune mechanisms by the multi-strain probiotic and Zn through the stimulation of local immunocompetent cells, including B lymphocytes that produce antibodies. Kaspers et al. (1991) excluded the embryonic synthesis of IgA and IgM and showed that their production begins 2–4 days

post-hatch in the case of IgM and 6–13 days post-hatch in the case of IgA. Contrasting findings were presented by Thorbecke et al. (1968), who showed that bursa cells in 18-day embryos were already capable of synthesizing IgM. Nevertheless, *in ovo* supplementation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate may also stimulate local antibody synthesis.

Interesting results were obtained in the present study for the IgA and IgM levels in the small intestine tissue. In the case of IgA, its concentration on DOH was lower in the experimental groups than in the control group, while the opposite was true for IgM on the same day. At 7 days post-hatch, IgA and IgM levels in the small intestine tissue were lower or comparable to those found in the control group. A high IgA concentration, mainly in the intestines, is usually associated with damage to the intestinal barrier and exposure to numerous antigens (Fan et al., 2024). The low concentration of this immunoglobulin determined in the intestinal tissue in the present study indicates that the intestinal barrier was not damaged. The potential change in the composition of the microbiome due to *in ovo* supplementation with the multi-strain probiotic and the supply of numerous antigens to the body also did not lead to the development of an inflammatory response. This status may be confirmed by the suppressed synthesis of pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α and the enhanced synthesis of anti-inflammatory cytokines IL-10 in the small intestine tissue. The increased IgM level in the intestinal tissue on DOH in the experimental groups is most likely the effect of the intensification of the GALT system response to antigenic stimulation during the rearrangement of the intestinal microbiome.

Changes in mRNA expression of these immunoglobulins were not observed until 7 days post-hatch. In each of the experimental groups, mRNA expression was higher than in control. In the case of IgA, it was highest in the group of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate, while mRNA expression of IgM was highest in the group administered the Zn-Gly chelate. It should be noted that probiotics can increase the number of cells producing IgA in the intestinal mucosa and lamina propria (Ohland and MacNaughton, 2010; Levkut et al., 2014). The increase in the mRNA expression of IgA and IgM indicates that the application of a mixture of beneficial bacteria in a multi-strain probiotic stimulates the proliferation and activity of B cells within the intestinal mucosa, which leads to the enhanced local production of immunoglobulins and thus protects the intestinal epithelium against invasion by pathogenic microbes, thereby ensuring homeostasis in the intestines.

Improvement in growth parameters is influenced by numerous factors, including increased villus height and crypt depth, lower FCR, and the intensification of gluconeogenesis processes in chicks and adult birds (El-Moneim et al., 2020; Das et al., 2021). It should be stressed that the administration of the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate did not significantly affect BWG or FCR (0–42 days) in the chickens receiving them *in ovo*, although in group II, which received only the multi-strain probiotic, BWG (0–42 days) was lower than in the control group and experimental groups III and IV. Similar results were reported by Majidi-Mosleh et al. (2016); Majidi-Mosleh et al. (2017), who noted no changes in the growth parameters of chicks following *in ovo* administration of strains of *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* and *Pediococcus acidilactici*. They did observe, however, that the probiotics had a beneficial effect

on the expression of the mucin gene and microbiota proliferation in the jejunum, and they recommended *in vivo* supplementation with probiotics in addition to *in ovo* technology. Contrasting findings were reported by Ravichandran et al. (2018), who showed that *in ovo* administration of various concentrations of *Lactobacillus acidophilus* increased body weight in broilers at 6 weeks of age. Shehata et al. (2022) also showed that the *in ovo* administration of *B. subtilis* increased BW, FI and FCR compared to the control group. According to these studies, this effect should be linked to improved intestinal function, an increase in the population of beneficial bacteria, a reduction in the population of harmful bacteria, regulation of the expression of mucin-2 genes, vascular endothelial growth factor (VEGF), sodium/glucose cotransporter 1 (SGLT1), interleukin 2 (IL-2) in the intestines, and a positive effect on their morphology. Discrepant results have also been obtained regarding the *in ovo* application of zinc. Kim and Kang (2022) showed no significant effect of zinc administered *in ovo* on body weight gain, feed intake, or FCR in the first 21 days of the life of broilers. The effects of this supplementation did not appear until 35 days of age, when a higher body weight was noted in broilers administered zinc *in ovo* and additionally in their feed. In turn, Hamza et al. (2022) demonstrated that *in ovo* administration of ZnSO₄ or ZnO-NPs increased the body weight of chickens at 21 and 35 days of age. These differences in the cited findings may be due to the effect of numerous internal and external factors affecting growth parameters in the case of *in ovo* technology: the dosage of supplements, the composition of the probiotic mixture, the day of administration, the *in ovo* technique used, the site of administration, the origin of the hatching eggs, the strain/line/breed of bird, egg storage conditions, and differences in the feed administered from hatching to slaughter at 42 days. It should be noted that in our experiment, the probiotic microorganisms and Zn-Gly chelate administered *in ovo* had a strong impact on the health of the chicks, which we also demonstrated in our previous studies (Ciszewski et al., 2023a; b). It is likely that zinc had no tangible effect on the growth rate because the birds' requirement for this element and other nutrients was fully met in the eggs from which the chicks hatched. This was the interpretation used by Kop-Bozday and Ocak (2015), who observed that *in ovo* supplementation with amino acids had no effect on growth parameters when they used hatching eggs with an optimal nutrient content.

In the present study, BWG in the first period of life (0–10 days) was higher in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo* (group III) and the group receiving Zn-Gly chelate (group IV) than in the control group, but these values were not statistically significant. Similar observations were made by Khaligh et al. (2019), who found that birds supplemented *in ovo* with *Lactobacillus salivarius* and *L. plantarum* achieved higher body weight in the first 10 days post-hatching. This was most likely due to the intensified absorption of nutrients by the yolk sac after hatching, which stabilized with age. Duan et al. (2021) also showed that *in ovo* application of a synbiotic increased BWG and FI between days 7 and 21 post-hatch, which indicates the promotion of early growth in chickens. In the present study, the temporary increase in BWG in the first days post-hatch may be due to the intensification of liver metabolism and nutrient absorption from the yolk sac. The results obtained indicate that *in ovo* supplements do not affect production efficiency and, at the same time, do not

stimulate growth under optimal feeding conditions. Interesting data were also obtained concerning the weight of the lymphatic organs. The development and growth of the bursa of Fabricius, thymus, and spleen were not affected by *in ovo* supplementation with either the multi-strain probiotic or Zn-Gly chelate in the period immediately after hatching. At 7 days post-hatch, statistically significant differences were shown only for the weight of the spleen, which was greater in all experimental groups than in control, and highest in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic. Previous studies have indicated that supplementation with Zn, such as in the form of nanoparticles (ZONPs), increases the relative weight of immune organs like the thymus, bursa of Fabricius, and spleen (El-Hallem et al., 2020). A similar effect has been reported following *in ovo* and *in vivo* administration of probiotics (Pender et al., 2017). Duan et al. (2021) also showed that *in ovo* administration of synbiotics led to an increase in immune organ indices, especially for the thymus and spleen, which improved the overall health of chickens and boosted their resistance to pathogens. It should be emphasized that the gastrointestinal microbiota and its metabolites act closely with GALT cells in chickens and play an important role in the development of local and systemic immune mechanisms. The early development of beneficial gut bacteria through *in ovo* supplementation—for example, with probiotics—can therefore enhance the systemic response in chickens. The increase in the weight of the spleen at 7 days post-hatch is due to the migration and early development of probiotic microbiota in the gastrointestinal tract following *in ovo* administration; however, stimulation by environmental strains is also likely. The microbiota modulated *in ovo* activated immunocompetent cells, mainly of the intestinal lymphoid epithelium and the GALT system, leading to an increase in antigen migration to the spleen. Antigen burden results in enhanced immune reactivity, leading to an increase in the size of the spleen—important for the health and immunity of birds (Fairbrother et al., 2004). The increase in spleen mass may therefore indicate increased recruitment of lymphocytes and phagocytic activity—phenomena typical of the activation of non-specific and adaptive immunity. Interesting results were obtained regarding the cytokine concentrations in the yolk sac. The groups receiving the multi-strain probiotic (group II) *in ovo* had higher levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β 1. At the same time, administration of the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate increased the concentrations of IL-6, IL-8 and IFN- γ . It is notable that the high expression of IFN- γ , IL-4, IL-10, and IL-18 is already found in the lymphatic organs of chickens, including the spleen, on day 12 of incubation, and persists up to 7 days post-hatch (Abdul-Careem et al., 2007). The results of the present study also clearly indicate the dominance of a pro-inflammatory cytokine profile in the yolk sac. The increased synthesis of Th1 pro-inflammatory cytokines in the yolk sac, like IL-1 β , may be due to the activation of the intracellular NF- κ B signaling pathway under the influence of antigenic stimulation (Rehman et al., 2021) by the probiotic strains contained in the multi-strain probiotic. Similarly, in the groups receiving Zn, the activation of pro-inflammatory pathways during embryonic development may be linked to the intensification of metabolic processes which use this element to build structural elements of the body, including cells involved in the immune response (Klasing, 2007).

In the present study, in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*, the concentrations of the pro-inflammatory cytokines IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , and IFN- γ determined in the serum and liver tissue immediately after hatching were low or comparable to the levels found in the control group. Similar observations were reported by Alizadeh et al. (2020), who showed that *in ovo* inoculation with multi-strain lactobacilli diminished the expression of genes of pro-inflammatory cytokines in the cecal tonsils, which indicates the anti-inflammatory activity of these bacteria in the intestine. The multi-strain probiotic administered *in ovo* in our experiment also contains *Lactobacillus* strains. The fact that this probiotic reduced the concentration of some cytokines, such as IL-2, which is synthesized by activated T lymphocytes involved in the proliferation and activation of Th (helper) and Tc (cytotoxic) cells, is indicative of the immunomodulatory properties of bacteria in naive chickens that have not been exposed to viral and bacterial infections. The low IL-6 and IL-8 levels resulting from the *in ovo* modulation of the microbiota may prove that probiotic bacteria are involved in maintaining immune homeostasis, preventing excessive development of the inflammatory response. At 7 days post-hatch, on the other hand, we showed an increase in the concentrations of pro-inflammatory cytokines in the liver (IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, and TNF- α) and serum (IL-6, IL-12, and IFN- γ) in the groups administered the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*. This increase should be interpreted as an element of the body's physiological adaptation to environmental antigens and not as a pathological inflammatory state. Alizadeh et al. (2021) also showed upregulation of the expression of interferon (IFN)- α , IFN- β , IL-8, IL-13, and IL-18 in the spleen and of IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-18 in the bursa of Fabricius in 10-day-old chicks administered a lactobacilli cocktail *in ovo*. The results of the present study suggest that *in ovo* application of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate modulates the immune response, maintains balance between the synthesis of Th1 and Th2 cytokines, inhibits inflammatory processes, and stimulates immune system development. This hypothesis may be supported by the high concentration of IL-6, which drives the differentiation of T lymphocytes toward the Th2 phenotype and stimulates the secretion of anti-inflammatory cytokines, leading to the suppression of an excessive immune response. It is also worth citing the results obtained for the serum concentrations of IL-8 and IFN- γ , which directly after hatching were lower in the groups of birds receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate than in the control. The inhibition of inflammatory functions shown in the experiment may be due to the suppression of the immune response following the use of the supplements, which may have impaired the activation of T cells essential to an effective immune response following post-hatch vaccination (Haq et al., 2011). On the other hand, this phenomenon can be treated as a temporary impairment in the synthesis of proteins due to metabolic changes taking place during hatching (Meijer et al., 2024). Nevertheless, it is undeniable that the changes in the concentrations of these cytokines are closely linked to a chick's ontogenetic development.

Opal and DePalo (2000) showed a reduction in the level of IL-10 in the serum and an increase in its level in the liver after hatching in groups receiving Zn-Gly chelate *in ovo*. The higher IL-10 level in the liver may be due to the activation of B lymphocytes by zinc,

directly or via other cytokines released from immunocompetent cells, which enhances humoral immune mechanisms. The activation of these processes is also evidenced by the increased concentrations of immunoglobulins IgA and IgY in the liver in the experimental groups. The low serum level of IL-8 in the groups administered the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo* coupled with a low IFN- γ level may indicate the absence of inflammation at this time or the inhibition of the Th2 immune response. Similarly, at 7 days post-hatch, the lack of differences in the IL-10 concentration in the serum and its decrease in the liver, especially in the group receiving the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate *in ovo*, coupled with high IFN- γ and TNF- α levels, point to the inhibition of the humoral response.

Comprehensive analysis of cytokine concentrations in the tissues of the small and large intestine and in the liver indicate tissue-specific determinants regulating cytokine synthesis that are dependent on tissue and organ development as the chick grows older as well as on antigenic stimulation. It should be noted, however, that no group of cytokines was shown to be dominant, and the results indicate that a balance was maintained in the production of type Th1 and Th2 cytokines. Differences in the concentrations of cytokines in the experimental groups between DOH and 7 days post-hatch can be presumed to depend on the age of the chicks and to be regulated not only by internal factors but also by the degree of maturity of the immune system. It is worth noting that on DOH, the mRNA expression of IgM in the intestines was low, which may have been due to the activation of a pro-inflammatory response weakening the adaptive mechanisms of the immune response. The simultaneous high concentration of anti-inflammatory IL-10 in the tissue of the small and large intestine following *in ovo* administration of the multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate suggests the existence of mechanisms balancing the inflammatory response profile, leading to a shift from a cellular to a humoral response (Giansanti et al., 2006). By striving to maintain the Th1/Th2 balance despite the antigen burden associated with *in ovo* supplementation, the developing immune system effectively maintains systemic homeostasis.

Ciszewski et al. (2023a) demonstrated that *in ovo* administration of multi-strain probiotics and Zn-Gly chelate significantly reduced hatchability, suggesting that *in ovo* injection of the two agents negatively impacts embryo survival. It is possible that the *in ovo* administration technique causes accidental damage to egg structures or microbiological contamination; the supplements may be toxic or disrupt homeostasis and impair embryo development. In our experiment, the synergistic use of the two compounds could have affected the pH and osmotic pressure of the embryo, triggering an immune response, translating into reduced hatchability. Therefore, it is necessary to optimize the doses of the *in ovo* tested supplements to minimize hatching disruptions. However, the preparations used in the experiment did not affect the viability of the chicks after hatching. The lack of significant differences in body weight after hatching between the control and experimental groups suggests that *in ovo* supplementation with the tested preparations did not inhibit embryonic growth. During the initial period of rearing, no increased growth of “*in ovo* feeding” chicks as was observed. Post-hatch mortality also remained low. Only the group receiving the multi-strain probiotic showed higher mortality in the first days of life, which could have

been the result of a microbial imbalance (dysbiosis) or an abnormal immune response (inflammatory response). The few scientific reports regarding *in ovo* probiotic injection indicate the safety of such procedures (Shehata et al., 2024). Our results encourage the search for alternative methods of supplementing these compounds.

5 Conclusions

In ovo supplementation with a multi-strain probiotic and zinc-glycine (Zn-Gly) chelate stimulates immunocompetent cells, metabolic processes, and the synthesis of acute-phase proteins in the liver. It also enhances immunoglobulin mRNA synthesis, thereby modulating the immune response in broiler chickens. The coupled use of a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate results in increased expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10) while simultaneously reducing the levels of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ and TNF- α), indicating a lack of excessive inflammatory response, maintenance of Th1/Th2 balance, and homeostasis in the body. Elevated SAA levels in the intestinal tissue and increased expression of IgA and IgM mRNA indicate the activation of local mucosal immunity. An increase in spleen weight was observed despite the lack of significant differences in growth parameters (BWG and FCR) and in the weight of the thymus and bursa of Fabricius, which is indicative of increased immune reactivity and impact on chick immunity post hatching. Although the synergistic use of both supplements *in ovo* may reduce hatchability, this type of supplementation is becoming a promising tool for strengthening immunity in newly hatched chicks, which may have practical implications for preventive healthcare in flocks under intensive poultry production conditions.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was approved by the Local Ethics Committee for Animal Testing at the University of Life Sciences in Lublin, Poland (approval number 106/2022, 17 October 2022). The study was conducted in accordance with local legislation and institutional requirements.

Author contributions

AC: Conceptualization, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review and editing. LJ: Investigation, Methodology, Project administration, Writing – original draft, Writing – review and editing. ZG: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing.

AM: Formal Analysis, Writing – original draft, Writing – review and editing. BK: Formal Analysis, Methodology, Writing – original draft, Writing – review and editing. MH: Methodology, Resources, Writing – original draft, Writing – review and editing. AR: Software, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing.

Funding

The author(s) declare that no financial support was received for the research and/or publication of this article.

Acknowledgments

The authors wish to thank Greenland Technologia EM, Janowiec, Poland, for supporting this research.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Abdul-Careem, M. F., Hunter, D. B., Lambourne, M. D., Barta, J., and Sharif, S. (2007). Ontogeny of cytokine gene expression in the chicken spleen. *Poult. Sci.* 86, 1351–1355. doi:10.1093/ps/86.7.1351
- Adler, K. L., Peng, P. H., Peng, R. K., and Klasing, K. C. (2001). The kinetics of hemopexin and a1-Acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens. *Avian Dis.* 45, 289–296. doi:10.2307/1592967
- Alizadeh, M., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Karimi, S. H., Bavanthasivam, J., et al. (2020). Effects of in ovo inoculation of multi-strain *Lactobacilli* on cytokine gene expression and antibody-mediated immune responses in chickens. *Front. Vet. Sci.* 7, 105. doi:10.3389/fvets.2020.00105
- Alizadeh, M., Bavanthasivam, J., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Alqazlan, N., et al. (2021). In ovo and oral administration of probiotic *Lactobacilli* modulate cell- and antibody-mediated immune responses in newly hatched chicks. *Front. Immunol.* 12, 664387. doi:10.3389/fimmu.2021.664387
- Almeida, J. G., Vieira, S. L., Gallo, B. B., Conde, O. R. A., and Olmos, A. R. (2006). Period of incubation and posthatching holding time influence on broiler performance. *Braz. J. Poult. Sci.* 8, 153–158. doi:10.1590/S1516-635X2006000300003
- Alsemgeest, S. P., Lambooy, I. E., Wierenga, H. K., Dieleman, S. J., Meerkerk, B., van Ederen, A. M., et al. (1995). Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (hp) in calves. *Vet. Q.* 17, 9–12. doi:10.1080/01652176.1995.9694521
- Araim, M. A., Nabi, F., Marghazani, I. B., Hassan, F. U., Soomro, H., Kalhoro, H., et al. (2022). In ovo delivery of nutraceuticals improves health status and production performance of poultry birds: a review. *World's Poult. Sci. J.* 78, 765–788. doi:10.1080/00439339.2022.2091501
- Ayalew, H., Wang, J., Wu, S., Qiu, K., Tekeste, A., Xu, C., et al. (2023). Biophysiology of in ovo administered bioactive substances to improve gastrointestinal tract development, mucosal immunity, and microbiota in broiler chicks. *Poult. Sci.* 102, 103130. doi:10.1016/j.psj.2023.103130
- Bonaventura, P., Benedetti, G., Albarède, F., and Miossec, P. (2015). Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun. Rev.* 14 (4), 277–285. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.008
- Caliendo, V., McKinney, P., Bailey, T., Kinne, J., and Wernery, U. (2013). Serum amyloid A as an indicator of health status in falcons. *J. Avian Med. Surg.* 27 (2), 83–89. doi:10.1647/2011-026
- Chamanza, R., Toussaint, M. J., van Ederen, A. M., van Veen, L., Hulskamp-Koch, C., and Fabri, T. H. (1999). Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary

Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2025.1646143/full#supplementary-material>

investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet. Q.* 21 (4), 158–162. doi:10.1080/01652176.1999.9695012

Ciszewski, A., Jarosz, L., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., et al. (2023a). Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* 102 (9), 102823. doi:10.1016/j.psj.2023.102823

Ciszewski, A., Jarosz, L. S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., et al. (2023b). Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants* 12 (11), 1905. doi:10.3390/antiox12111905

Das, R., Mishra, P., and Jha, R. (2021). In ovo feeding as a tool for improving performance and gut health of poultry: a review. *Front. Vet. Sci.* 8, 754246. doi:10.3389/fvets.2021.754246

de Oliveira, J. E., van der Hoeven-Hangoor, E., van de Linde, I. B., Montijn, R. C., and van der Vossen, J. (2014). In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. *Poult. Sci.* 93 (4), 818–829. doi:10.3382/ps.2013-03409

Dong, S., Li, L., Hao, F., Fang, Z., Zhong, R., Wu, J., et al. (2024). Improving quality of poultry and its meat products with probiotics, prebiotics, and phytoextracts. *Poult. Sci.* 103 (2), 103287. doi:10.1016/j.psj.2023.103287

Duan, A. Y., Ju, A. Q., Zhang, Y. N., Qin, Y. J., Xue, L. G., Ma, X., et al. (2021). The effects of in ovo injection of synbiotics on the early growth performance and intestinal health of chicks. *Front. Vet. Sci.* 8, 658301. doi:10.3389/fvets.2021.658301

El-Haliem, H. S. A., Attia, F. A. M., Saber, H. S., and Hermes, I. H. (2020). Impacts of zinc oxide nano-particles supplementation in broiler diets on growth performance, some carcass characteristics and immune organs. *Egypt. J. Nutr. Feeds* 23 (1), 113–122. doi:10.21608/ejnf.2020.95825

El-Moneim, A. E. E. A., El-Wardany, I., Abu-Taleb, A. M., Wakwak, M. M., Ebeid, T. A., and Saleh, A. A. (2020). Assessment of in ovo administration of *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* on performance, ileal histomorphometry, blood hematological, and biochemical parameters of broilers. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12 (2), 439–450. doi:10.1007/s12602-019-09549-2

Fairbrother, A., Smits, J., and Grasman, K. (2004). Avian immunotoxicology. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 7 (2), 105–137. doi:10.1080/10937400490258873

Fan, Y., Wang, Y., Xiao, H., and Sun, H. (2024). Advancements in understanding the role of intestinal dysbiosis mediated mucosal immunity in IgA nephropathy. *BMC Nephrol.* 25, 203. doi:10.1186/s12882-024-03646-3

- development differ between genetically divergent broiler lines. *BMC Genomics* 16 (1), 418. doi:10.1186/s12864-015-1646-6
- Sevimli, A., Misirlioğlu, D., Yağci, A., Bülbül, A., Yilmaztepe, A., and Altunbaş, K. (2008). The role of chicken IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha in the occurrence of amyloid arthropathy. *Vet. Res. Commun.* 32 (7), 499–508. doi:10.1007/s11259-007-9034-6
- Shehata, A. M., Paswan, V. K., Attia, Y. A., Abougabal, M. S., Khamis, T., Alqosaibi, A. I., et al. (2022). In ovo inoculation of *Bacillus subtilis* and raffinose affects growth performance, cecal microbiota, volatile fatty acid, ileal morphology and gene expression, and sustainability of broiler chickens (*Gallus Gallus*). *Front. Nutr.* 9, 903847. doi:10.3389/fnut.2022.903847
- Shehata, A. M., Seddek, N. H., Khamis, T., Elnesr, S. S., Nouri, H. R., Albasri, H. M., et al. (2024). In-ovo injection of *Bacillus subtilis*, raffinose, and their combinations enhances hatchability, gut health, nutrient transport- and intestinal function-related genes, and early development of broiler chicks. *Poult. Sci.* 103 (11), 104134. doi:10.1016/j.psj.2024.104134
- Sloan, H. J. (1936). The operative removal of the yolks from newly-hatched chicks. *Poult. Sci.* 15 (1), 23–27. doi:10.3382/ps.0150023
- Speelman, T., Dale, L., Louw, A., and Verhoog, N. J. D. (2022). The association of acute phase proteins in stress and inflammation-induced T2D. *Cells* 11 (14), 2163. doi:10.3390/cells11142163
- Starke, I. C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J., and Vahjen, W. (2014). The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87 (2), 416–427. doi:10.1111/1574-6941.12233
- Takahashi, K., Ip, W. K. E., Michelow, I. C., and Ezekowitz, R. A. B. (2006). The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr. Opin. Immunol.* 18 (1), 16–23. doi:10.1016/j.coi.2005.11.014
- Tako, E., Ferket, P. R., and Uni, Z. (2005). Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. *J. Nutr. Biochem.* 16 (6), 339–346. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.01.002
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (10), a016295. doi:10.1101/cshperspect.a016295
- Thorbecke, G. J., Warner, N. L., Hochwald, G. M., and Ohanian, S. H. (1968). Immune globulin production by the Bursa of fabricius of young chickens. *Immunology* 15 (1), 123–134.
- Urieli-Shoval, S., Linke, R. P., and Matzner, Y. (2000). Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* 7 (1), 64–69. doi:10.1097/00062752-200001000-00012
- Wong, E. A., and Uni, Z. (2021). Centennial review: the chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poult. Sci.* 100 (3), 100821. doi:10.1016/j.psj.2020.11.004
- Wu, R., Chen, C., and Zhang, X. (2022). Label-free LC-MS/MS analysis reveals different proteomic profiles between egg yolks of silky fowl and ordinary chickens. *Foods* 11 (7), 1035. doi:10.3390/foods11071035
- Yadgary, L., Cahaner, A., Kedar, O., and Uni, Z. (2010). Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 89 (11), 2441–2452. doi:10.3382/ps.2010-00681
- Zhang, L., Zhang, R., Jia, H., Zhu, Z., Li, H., and Ma, Y. (2021). Supplementation of probiotics in water beneficial growth performance, carcass traits, immune function, and antioxidant capacity in broiler chickens. *Open Life Sci.* 16 (1), 311–322. doi:10.1515/biol-2021-0031
- Zhu, W., Zhang, J., He, K., Geng, Z., and Chen, X. (2020). Proteomic analysis of fertilized egg yolk proteins during embryonic development. *Poult. Sci.* 99 (5), 2775–2784. doi:10.1016/j.psj.2019.12.056
- Zulkifli, I., Abdullah, N., Azrin, M. N., and Ho, Y. W. (2000). Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing Lactobacillus cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Br. Poult. Sci.* 41 (5), 593–597. doi:10.1080/713654979

Supplementary Material

Supplementary Table S1.

Chick mortality during the experiment.

Group	Starter	Grower	Finisher	Total (percent mortality)
I	1	0	0	1 (0.67%)
II	3	2	0	5 (3.33%)
III	1	0	1	2 (1.33%)
IV	2	0	0	2 (1.33%)
P-value				0.362

**Oświadczenia współautorów o ich udziale w artyku-
łach stanowiących cykl publikacji składających się
na rozprawę doktorską**

Artur Ciszewski

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2026

Oświadczenia współautorów – Praca I

Lek. wet. Artur Ciszewski

Katedra Uprzodologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, J., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Moją udział procentowy szacuję na 80%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVEL) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kureczat brojlerów”.



Podpis

Lublin, 03.11.2023

Dr hab. Lukasz Janusz, profesor UP

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Janusz, L., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9), 102873, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102873>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu metodyki badań, realizacji doświadczenia oraz interpretacji wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.


Podpis

Dr hab. Agnieszka Marek profesor UP
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, E., Marek, A., Michalak, K., Grzędzki, Z., Kaczmarek, P., Ryszał, A., Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science. 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w pobieraniu materiału badawczego oraz współudziale w korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyka wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kuroczek broilerów”

Podpis



Lublin, 03.11.2023

Dr Katarzyna Michalak

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciszewski, A., Jurosz, L., Marek, A., Michalak, K., Grapieżki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A. **Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens**, Poultry Science, 2023, 102(9), 102823. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu założeń metodycznych do pracy i interpretacji wyników badań, oraz przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyka wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojerskich”.

Podpis

Katarzyna Michalak

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, I., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2025, 102(9), 102825, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102825>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na korekcie manuskryptu oraz zebraniu danych literaturowych. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis



Lublin, 03.11.2025

Dr n. wet. Beata Kaczmarek

Zakład Chorób Wewnętrznych Zwierząt Gospodarskich i Koní

Katowice i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, E., Marek, A., Michałak, K., Gąbriki, Z., Kaczmarek, B., Ryslak, A., Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a meloxanin probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*, 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zbieraniu materiału (pobranie materiału do badań immunologicznych). Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Anny Ciszewskiej pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurozgat brojlerów”.



Podpis

Dr Anna Rysiak

Katedra Botaniki, Mykologii i Ekologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, J., Marek, A., Michałak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined *in vivo* administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie statystycznej wyników badań oraz przedstawienia ich w formie graficznej. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania *in vivo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt broilerów”

Podpis



Lublin, 3rd November 2023

Vet. Artur Ciszewski

Department of Epizootiology and Clinical Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jacosz, L., Marek, A., Michalak, K., Gniłcki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A., Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, my contribution to this work involved formulating the research concept, co-developing the research methodology, participating in the collection of research material, conducting laboratory experiments, performing statistical analysis and interpreting study results, preparing and translating the initial draft of the manuscript, and proofreading the final revised manuscript. I estimate my percentage contribution at 80%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Associate Professor Lukasz Jarosz

Department of Epizootology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L., Marek, A., Muchała, K., Ciągłki, Z., Kaczmarek, B., Kysak, A., Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, my contribution to this work involved participating in the development of the research methodology, carrying out the experiment, and interpreting study findings. I estimate my percentage contribution at 10%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVPIT) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Lublin, 3rd November 2023

Associate Professor Agnieszka Marek

Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9): 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, my contribution to this work involved co-participation in collecting the research material and in proofreading the manuscript. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Dr. Katarzyna Michalska

Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Liszewski, A., Jarosz, L., Marek, A., Michalak, K., Gąbłzki, Z., Kaczmarski, B., Rysiak, A.: Effect of combined, in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(9): 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, my contribution to this work involved co-developing the methodological framework of the study and interpreting study results, as well as handling the editorial process (Corresponding Author). I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVE II) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature

Katarzyna Michalska

Lublin, 3rd November 2023

Prof. Dr. Hab. Zbigniew Grądzki

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, I., Marek, A., Michalak, K., Grądzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*. 2023. 102(9): 102823. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, my contribution to this work involved proofreading the manuscript and gathering the relevant literature. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".


Signature

Dr inż. wet. Beata Kaczmarek

Sub-Department of Internal Medicine of Farm Animals and Horses

Department and Clinic of Internal Animal Disease

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the in the paper by Ciszewski, A., Jaworski, J., Marek, A., Michalak, K., Gładzi, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A., Effect of combined in ovo administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multi-strain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. Poultry Science, 2023, 102(5): 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102823>, my contribution to this work was to participate in collecting the material (collecting material for immunological tests). I estimate my contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled „The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVEU) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens”.

Signature



Dr Anna Rysiak

Department of Botany, Mycology, and Ecology

Maria Curie-Skłodowska University

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L., Marek, A., Michalak, K., Gładzki, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined *in ovo* administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*. 2023, 102(9), 102823, <https://doi.org/10.1016/j.psci.2023.102823>, my contribution to this work involved conducting the statistical analysis of study results and preparing their graphical presentation. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (BM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Oświadczenia współautorów – Praca II

Lublin, 03.11.2025

Lek. wet. Artur Ciszewski

Katedra Epizootologii i Klinika Choroób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jurosz, L.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Bysiuk, A., Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905 <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i określenie celu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przedrukowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyka wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVELT) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiadzi immunologicznej u szczepią brojlerów”.



Podpis

Lublin, 07.11.2025

Dr hab. Łukasz Jarosz, profesor UPL

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OSWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Bielecka, A., Matc, A., Szyneczak, B., Gładzi, Z., Rysiak, A., Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, badań, części zagadnień metodycznych i współudziale w realizacji eksperymentu, analizie uzyskanych wyników badań, współudziale w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brejlerów”.



Podpis

Lublin, 03.11.2025

Mgr Arleta Bielecka

Katedra Biochemii

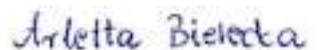
Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, Ł.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiak, A.: Effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants* (Basel) 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał współudziale w opracowaniu metodyki badań oraz dostarczeniu odczynników i wykonywaniu badań laboratoryjnych. Mój udział procentowy szacuje na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis 

Lublin, 02.11.2025

Dr hab. Agnieszka Marek, profesor UP

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiek, A.: Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. Antioxidants (Basel) 2023, 12(11), 1905 <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie i interpretacji wyników badań, oraz udziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyka wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (LM PROVIT) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki bariernej i komórkowej odporności immunologicznej u kurcząt brojlerów”

Podpis



Lek. wet. Bartłomiej Szymczak

Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych

Zakład Patofizjologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, I.S., Dzięcińska, A., Marek, A., Szymczak, B., Gładzi, Z., Rysiek, A.: Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905 <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu i archiwizowaniu wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVEIT) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis



Lublin, 03.11.2025

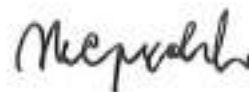
Prof. dr hab. Zbigniew Chądziński
Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Chądziński, Z., Rysiak, A., Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. Antioxidants (Basel) 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na uczestnictwie w realizacji doświadczenia oraz nadzorowaniu i kontroli realizacji badań. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis



Dr Anna Rysiek

Katedra Botaniki, Mykologii i Ekologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarecz, L.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiek, A., Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants* (Basel) 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antox12111905>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie wyników badań, przedstawieniu ich w formie graficznej, oraz dostarczeniu części materiałów diagnostycznych do realizacji badań. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyka wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kaczek hucjuszek”.

Podpis



Lublin, 3rd November 2025

Vet. Artur Ciszewski

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Uradzki, Z., Rysiak, A.: Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antox12111905>, my contribution to this work involved formulating the research concept and establishing the objectives of the study, co-developing the research methodology, participating in the collection of research material, conducting laboratory experiments, performing statistical analysis and interpreting the results, preparing and translating the manuscript draft, and proofreading the final revised manuscript. I estimate my percentage contribution at 80%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (IM-PROVET) and Zinc Glycyl chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Associate Professor Łukasz Jarosz

Department of Epidemiology and Clinical Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Janusz, I. S., Hejdecka, A., Marck, A., Szymczak, B., Gładzki, Z., Rysak, A.: Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants* (Basel) 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, my contribution to this work involved formulating the research concept, co-developing certain methodological aspects, participating in the execution of the experiment, analyzing the results, contributing to the preparation of the initial manuscript draft, and handling the editorial process (Corresponding Author). I estimate my percentage contribution at 10%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PRIOVIT) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Lublin, 03.11.2025

Mgr Arleta Bielecka

Department of Biochemistry

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, Ł.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiak, A.: Effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. Antioxidants (Basel) 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, my contribution to this work included participation in developing the research methodology, providing reagents and performing laboratory tests. I estimate my contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled „The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens”.

Signature

Arleta Bielecka

Lublin, 3rd November 2025

Associate Professor Agnieszka Marek

Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, I.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysak, A.: Effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905, <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, my contribution to this work involved performing the analysis and interpreting study results as well as assisting in the preparation and revision of the manuscript. I estimate my percentage contribution at 3%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (LM PROVEL) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Prof. Bartłomiej Szymczak

Department of Preclinical of Veterinary Sciences

Sub-Department of Pathophysiology

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, I.S., Dzialecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Gładziński, Z., Rysiak, A.: Effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1995. <https://doi.org/10.3390/antiox12111995>, my contribution to this work involved organizing and archiving study results. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Prof. Dr. Hab. Zbigniew Grądzki

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Janusz, I. S., Bielecka, A., Maszk, A., Szymczak, B., Grądzki, Z., Rysiak, A.: Effect of *in vivo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antox12111905>, my contribution to this work involved taking part in execution of the experiment, as well as supervising and controlling the research process. I estimate my percentage contribution at 25%.

I am aware that this work, of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in vivo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (FM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Dr. Anna Rysiak

Department of Botany, Mycology, and Ecology

Maria Curie-Skłodowska University

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Janosz, J.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grędzki, Z., Rysiak, A.: Effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905>, my contribution to this work involved performing the analysis of study results, preparing their graphical presentation, and supplying part of the diagnostic materials used in the study. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work, of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Oświadczenia współautorów – Praca III

Lublin, 03.11.2025

Lek. wet. Artur Ciszewski

Katedra Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jamsz, L.S., Michalak, K., Marek, A., Grądzki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysnik, A. – Protein and peptide changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate – preliminary research. Current Issues in Molecular Biology 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3190/cimr-46020080>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i określenie celu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych – analizie poziomu cynku, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurecząt brojlerów”.



Podpis

Dr hab. Łukasz Jarosz profesor UP
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, Ł.S., Michalak, K., Marek, A., Gradzki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A., Proteomic and peptidome changes and Zn concentration in chicken after *in ovo* stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, części zgodnień metodycznych i współudziale w realizacji eksperymentu, analizie uzyskanych wyników badań, współudziale w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 8%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVEET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.


Podpis

Dr Katarzyna Michalak

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, J. S., Michalak, K., Marek, A., Graczyk, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280, <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu założeń metodycznych do pracy, analizie i korekcie uzyskanych wyników badań oraz przygotowaniu materiału diagnostycznego do badań. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (UM PROVIT) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis

Katarzyna Michalak

Lublin, 01.11.2025

Dr hab. Agnieszka Marek profesor UP

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIAĐCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Michałak, K., Marek, A., Grądzki, Z., Wawrzyłowski, J., Szymczak, B., Rysiek, A. Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after *in ovo* stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (FM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis



Prof. dr hab. Zbigniew Gradziś

Katedra Epidemiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Janusz, E.S., Michałak, K., Marek, A., Gąsłki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysak, A. - Proteinic and peptidomic changes and Zn-Gly excretion after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly excretion - preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.1193/cimb/6020080>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na uczestnictwie w realizacji doświadczenia oraz nadzorowaniu i kontroli realizacji badań. Mój udział procentowy szacuję na 24%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne - produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurecząt brojlerów”.

Podpis



Lublin, 03.11.2025

Dr Jacek Wawrzykowski

Katedra Biochemii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Janusz, I. S., Michałak, K., Marek, A., Grądzka, Z., Wawrzykowski, J., Szymczuk, B., Rysiak, A. Proteomic and peptidomic changes and Zn concentration in chicken after *in ovo* stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate – preliminary research. Current Issues in Molecular Biology 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.1190/cimb46020080>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał współudzielić w wykonaniu badań laboratoryjnych – SDS-PAGE. Mój udział procentowy szacuję na 1%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kucząt brojlerów”.



Zodpis

Lek. wet. Bartłomiej Szymczak

Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych

Zakład Patofizjologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OSWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, J.S., Michalak, K., Marek, A., Graczyk, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Proteomic and peptidomic changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020880>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu i archiwizowaniu wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PRO-VIT) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis



Dr Anna Rysiak

Katerpa Butanki, Mykologia i Ekologia

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Michalak, K., Marck, A., Cirałdki, Z., Wawrzykowska, J., Szymczak, B., Rysiak, A. Proteomic and peptidomic changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020380>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie wyników badań i przedstawieniu ich w formie graficznej. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Anny Ciszewskiej pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kaczek brojlerów”.

Podpis



Lublin, 3rd November 2025

Vet. Artur Ciszewski

Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarnasz, L.S., Michalak, K., Marek, A., Gębicki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysjak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after *in ovo* stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, my contribution to this work involved formulating the research concept and establishing the objectives of the study, co-developing the research methodology, co-participating in the collection of research material, conducting laboratory experiments – zinc level analysis, performing statistical interpretation of study results, preparing and translating the initial manuscript draft, and proofreading the final revised manuscript. I estimate my percentage contribution at 50%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Lublin, 3rd November 2023

Associate Professor Łukasz Jurek

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jurek, L.S., Michalak, K., Marek, A., Gajdacki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, my contribution to this work involved formulating the research concept, developing certain methodological aspects and co-participating in the execution of the experiment, analyzing the results, co-participating in the preparation of the initial manuscript draft, and handling editorial process (Corresponding Authors). I estimate my percentage contribution at 8%.

I am aware that this work, of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Dr Katarzyna Michalak

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Michalak, K., Marek, A., Grądzka, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Protein and peptide changes and Zn concentration in chicken after *in ovo* stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate preliminary research, *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280, <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, my contribution to this work involved co-participation in developing research methodology, analysis and revision of study results as well as preparation of diagnostic material for analyses. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens"

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Associate Professor Agnieszka Marek

Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, J.S., Michalak, K., Marek, A., Grądzki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2): 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb4602080>, my contribution to this work involved co-participation in the preparation of the initial manuscript draft and in manuscript proofreading. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (BM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Prof. Dr. Hab. Zbigniew Grądzki

Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, E.S., Michalak, K., Marek, A., Grądzki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysjak, A. "Proteomic and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in vivo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, my contribution to this work involved participation in the execution of the experiment as well as in supervising and controlling the research process. I estimate my percentage contribution at 25%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in vivo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".


Signature

Lublin, 1st November 2025

Dr. Jacek Waczykowski

Department of Biochemistry

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Michałak, K., Marek, A., Grądzki, Z., Waczykowski, J., Szymczak, B., Rysak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo sorption with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1255-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, my contribution to this work involved co-participation in the execution of laboratory analyses - SDS-PAGE. I estimate my percentage contribution at 25%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Yet. Bartłomiej Szymczak

Department of Preclinical of Veterinary Sciences

Sub-Department of Pathophysiology

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarcz, J. S., Michalak, K., Marek, A., Gładzi, Z., Wawczykowski, J., Szymczak, B., Kysiak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390-cimb46020080>, my contribution to this work involved organizing and archiving study results. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Dr. Anna Rysiak

Department of Botany, Mycology, and Ecology

Maria Curie-Skłodowska University

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Michalak, K., Marek, A., Gajdzki, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after in ovo stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080>, my contribution to this work involved performing the analysis of study results and preparing their graphical presentation. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work, of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVELT) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Oświadczenia współautorów – Praca IV

Lek. wet. Artur Ciszewski

Katedra Epidemiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, F., Grądzka, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, celu i planu badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przeformułowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in-ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (DM PROVEET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kureczek brojlerów”.



Podpis

Lublin, 03.11.2025

Dr hab. Łukasz Jarosz, profesor UP

Katedra Epizootiologii i Klinika ChOROBY Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L., Gładzi, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A. Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu części zagadnień metodycznych i współdziałe w realizacji eksperymentu, zapewnieniu finansowania i nadzoru nad realizacją badań eksperymentalnych, współdziałe w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korekturek). Mój udział procentowy szacuję na 8%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt huplerów”.


Podpis

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewska, A., Jarosz, I., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysniak, A. : Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na nadzercze w realizacji badań diagnostycznych i doświadczenia oraz współudziale w zbieraniu literatury. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”

Podpis



Dr hab. Agnieszka Marek profesor UP
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OSWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Janasz, L., Gładziński, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiatkowiak, M., Rysiek, A. - Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w pobieraniu materiałów badawczych, analizie uzyskanych wyników badań, oraz współudziale w korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (IM PROVE1) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurecząt brojlerów”.

Podpis





UNIwersytet
PRZYRODNICZY
w Lublinie



WYDZIAŁ
MEDYCYN
WETERYNARYJNEJ

Lublin, 03.11.2025

Dr hab. Sebastian Kaczmarek, profesor UPP

Katedra Żywienia Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewska, A., Jarosz, L., Gładzi, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Ryzak, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w analizie i interpretacji wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 7%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis

Lublin, 16.07.2025

Prof. dr hab. Małgorzata Kwiecień
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Instytut Żywności Zwierząt i Biomatologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Janusz, L.S., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Ryszak, A., Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science*, 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu metodologii oraz walidacji wyników. Mój udział procentowy szacuję na 4%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVE1) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt hrujęców”.



Profesor dr hab. inż.
Małgorzata Kwiecień

Dr Anna Rysiak

Katedra Botaniki, Mykologii i Ekologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszowski, A., Jurosz, L., Grądzki, Z., Mirek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie statystycznej wyników badań oraz przedstawieniu ich w formie graficznej. Moją udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyka wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PRO-VET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojerskich”.



Podpis

Lublin, 3rd November 2023

Vet. Artur Ciszewski

Department of Epizootology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L., Grądzki, Z., Marek, A., Kuczmarek, S., Kwarciek, M., Rysiek, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution to this work involved formulating the study concept, objectives of the study, and experimental design, co-developing the research methodology, co-participating in the collection of research material, conducting laboratory experiments, performing statistical interpretation of study results, preparing and translating the initial manuscript draft, and proofreading the final revised manuscript. I estimate my percentage contribution at 80%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (LM PROVIT) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Lublin, 3rd November 2025

Associate Professor Łukasz Jarośz

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarośz, Ł., Grądzki, Z., Morek, A., Kaczmarek, S., Kwiercień, M., Rysiak, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution to this work involved developing certain methodological aspects, co-participating in the execution of the experiment, providing funding and supervising the execution of experimental research, co-participating in the preparation of the initial manuscript draft, and handling the editorial process (Corresponding Author). I estimate my percentage contribution at 8%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Lublin, 3rd November 2025

Prof. Dr. Hab. Zbigniew Grądzki

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Janasz, J., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwieceń, M., Rysak, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution to this work involved supervising the execution of diagnostic analyses and the experiment, and co-participation in gathering literature. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".


Signature

Lublin, 3rd November 2025

Associate Professor Agnieszka Marek

Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, J., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiatkiewicz, M., Rybak, A.: Effect of *in ovo* feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution to this work involved co-participation in analytical material collection, analysis of study results, and co-participation in manuscript proofreading. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVE-1) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Associate Professor Sebastian Kaczmarek
Department of Animal Nutrition
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences
Poznań University of Life Sciences

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L., Chędzki, Z., Mirek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A.: Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution to this work involved co-participation in the analysis and interpretation of study findings. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (PM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 16.07.2024

Prof. dr hab. Małgorzata Kwiecień
Faculty of Animal Sciences and Biocconomy
Institute of Animal Nutrition and Bromatology
University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Grodzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysak, A.: Effect of *in ovo* feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science*, 2024, 289, 105577, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution consisted in developing the methodology and validating of the results. I estimate my contribution at 4%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Anna Ciszewski, titled „The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM-PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens”.

Profesor dr hab. inż.

Małgorzata Kwiecień
Małgorzata Kwiecień

Signature

Dr Anna Rysiak

Department of Botany, Mycology, and Ecology

Maria Curie-Skłodowska University

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarnó, L., Gładki, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A. Effect of in ovo feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577>, my contribution to this work involved conducting the statistical analysis of study results and preparing their graphical presentation. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Oświadczenia współautorów – Praca V

Lec. wet. Artur Ciszewski

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, E.S., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hendysz, M., Rysiak, A., Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w zbieraniu materiału badawczego, wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacji statystycznych wyników badań, napisaniu i przetłumaczeniu wstępnej wersji manuskryptu oraz korekty manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku włączeczkowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt broilerów”.



Podpis

Dr hab. Łukasz Jarosz, profesor UP

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

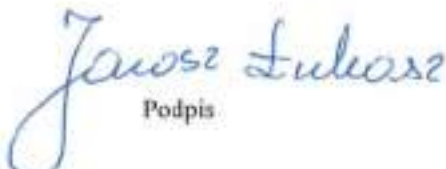
Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, Ł. Ś., Gradzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysniak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143, <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu części ogólnych metodycznych i współudziale w realizacji eksperymentu, nadzorze nad realizacją eksperymentu, udziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu, oraz przeprowadzenie procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywnie m. krobogarnizny (FM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kureząt brojlerów”.


Podpis



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
w Lublinie



WYDZIAŁ
MEDYCYN
WETERYNARYJNEJ

Lublin, 03.11.2025

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorob Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdyś, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143, <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie i interpretacji wyników badań, weryfikacji uzyskanych wyników oraz udziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojerskich”.

Pudpis

Lublin, 03.11.2025

Dr hab. Agnieszka Marek, profesor UP

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Praków

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OSWIAIACZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciszewski, A., Jarosz, L.S., Girądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysak, A. Influence of a multispecies probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*. 2025. 16, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie i interpretacji wyników badań, oraz udziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (HM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt brojlerów”.

Podpis



Lublin, 03.11.2025

Dr inż. Beata Kuczmarek

Zakład Chorób Wewnętrznych Zwierząt Gospodarskich i Koci

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytecie Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciszewska, A., Jarosz, Ł.S., Grądzi, Z., Marek, A., Kuczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyszukaniu i analizie części badań immunologicznych (testy ELISA), oraz korektę manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVI-T) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kaczek broilerów”.

Podpis



Lublin, 09.11.2025

Dr hab. Marcin Hejdysz

Katedra Hodowli Zwierząt i Oceny Surowców

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarsz, Ł.S., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. Frontiers in Physiology, 2025, 16, 1646143 <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu metodycznym części badań (parametry produkcyjne), dostarczeniu części materiałów badawczych, oraz udziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, której jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wrażliwości humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kaczek hucwerek”.

Podpis



Dr Anna Rysiek

Katedra Botaniki, Mykologii i Ekologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

OŚWIADCZENIE:

Oświadczam, że w pracy: Ciszewski, A., Jarosz, L.Ś., Gajdzka, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiek, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143 <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie wyników badań oraz przedstawieniu ich w formie graficznej, oraz udziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Mam świadomość, że niniejsza praca, którą jestem współautorem, została włączona do rozprawy doktorskiej Artura Ciszewskiego pt. „Wpływ podawania in ovo probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne makroorganizmy (EM PROVET) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurozgat brojlerów”.

Podpis



Lublin, 3rd November 2025

Vet. Artur Ciszewski

Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Janusz, I., S., Grędzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejōysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 15, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, my contribution to this work involved formulating the study concept, co-developing the research methodology, co-participating in the collection of research material, conducting laboratory experiments, performing statistical interpretation of study results, preparing and translating the initial manuscript draft, and proofreading the final revised manuscript. I estimate my percentage contribution at 80%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of [humoral] and cellular immune response in broiler chickens".

Ciszewski Artur

Signature

Lublin, 3rd November 2025

Associate Professor Łukasz Jarnusz

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jurecz, E.S., Gładziś, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejduś, M., Rysiak, A. Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143, <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, my contribution to this work involved developing certain methodological aspects and co-participating in the execution of the experiment, supervising the execution of experimental research, participating in manuscript preparation and proofreading, and handling the editorial process (Corresponding Author). I estimate my percentage contribution at 10%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Lublin, 3rd November 2025

Prof. Dr. Hab. Zbigniew Grądzki

Department of Epidemiology and Clinic of Infectious Diseases

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarecz, E.S., Grądzki, Z., Marek, A., Kuczmarski, B., Hejduś, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, my contribution to this work involved the analysis and interpretation of study results, validation of study results, and participation in manuscript preparation and proofreading. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".



Signature

Associate Professor Agnieszka Marek
Department of Preventive Veterinary and Avian Diseases
Faculty of Veterinary Medicine
University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jamsz, L.S., Grządzi, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hojdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2023, 10, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1646143>, my contribution to this work involved analyzing and interpreting study results and preparing their graphical presentation as well as participation in manuscript preparation and proofreading. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (UM PROVIST) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 03.11.2025

Dr n. wet. Beata Kaczmarek

Sub-Department of Internal Medicine of Farm Animals and Horses

Department and Clinic of Internal Animal Disease

Faculty of Veterinary Medicine

University of Life Sciences in Lublin

STATEMENT

I hereby declare that in the in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, I. S., Grądzki, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16: 1646143, <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, my contribution to this work included performing, and analyzing some of the immunological tests (ELISA tests), and proofreading the manuscript. I estimate my contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled „The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens”.

Signature



Dr. Hab. Marcin Hejdysz

Department Of Animal Breeding And Product Quality Assessment

Poznań University of Life Sciences

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jurek, F.S., Grzanka, Z., Marek, A., Kuczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered in ovo, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646143 <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143>, my contribution to this work involved developing certain study methodology (production parameters), providing part of analytical materials, and participating in manuscript preparation and proofreading. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of in ovo administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature



Lublin, 3rd November 2025

Dr. Anna Rysiak

Department of Botany, Mycology, and Ecology

Maria Curie-Skłodowska University

STATEMENT

I hereby declare that in the paper by Ciszewski, A., Jarosz, E.S., Gładzi, Z., Marek, A., Kaczmarek, H., Hejdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered *in ovo*, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology*, 2025, 16, 1646141. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646141>, my contribution to this work involved analyzing study results and preparing their graphical presentation as well as participation in manuscript preparation and proofreading. I estimate my percentage contribution at 2%.

I am aware that this work in which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Artur Ciszewski, titled "The effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic containing effective microorganisms (EM PROVET) and Zn-Gly chelate on health and production parameters as well as indicators of humoral and cellular immune response in broiler chickens".

Signature

