Wiadomości Zootechniczne, R. LV (2017), 3: 64–73

Badanie *in ovo* nad wpływem naturalnych antyoksydantów na namnażanie się wirusa NDV w zarodkach kurzych

Katarzyna Ognik, Ewelina Cholewińska, Katarzyna Kwiatkowska, Adam Liczmański, Jerzy Lechowski

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Biochemii i Toksykologii, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Rzekomy pomór drobiu (NDV) wywoływany przez wysoko zjadliwego wirusa *Newcastle disease* dotyka zarówno dzikie, jak i udomowione gatunki ptaków. Choroba ta przez lata rozprzestrzeniła się we wszystkich krajach świata, przyczyniając się do ogromnych strat ekonomicznych w sektorze przemysłu drobiarskiego związanych z padnięciami drobiu, kosztami likwidacji ferm i odszkodowań oraz wstrzymaniem obrotu i eksportu produktów drobiowych (Alexander, 2000).

Przebieg i obraz choroby bywa zróżnicowany i jest uwarunkowany stopniem zjadliwości szczepu wirusa, drogą zakażenia, gatunkiem oraz wiekiem ptaka, statusem immunologicznym organizmu, jak również zakażeniami towarzyszącymi lub stresem (Seal i in., 2000). Zakażone ptaki stają się apatyczne i senne, obserwuje się też utratę apetytu, biegunkę oraz spadek nieśności. Niekiedy dochodzą także objawy neurologiczne, m.in. drżenie mięśni i porażenie kończyn. Zakażenie wirusem NDV cechuje wysoka śmiertelność, sięgająca nawet do 100% ptaków w stadzie (Beard i Hanson, 1984). Do tej pory nie opracowano jednak skutecznego lekarstwa przeciwko NDV (Orajaka i in., 1999). Stąd też, obecnie jednym z najpowszechniejszych sposobów walki z tą chorobą jest prowadzenie działań prewencyjnych w postaci rutynowych szczepień ochronnych drobiu hodowlanego (Seal i in., 2000; Boven i in., 2008). Szczepienie ptaków co prawda pomaga ograniczyć zachorowalność na rzekomy pomór drobiu oraz łagodzi objawy kliniczne zakażenia, jednakże nie gwarantuje braku wystąpienia infekcji, jak również często skutkuje wzrostem podatności immunizowanych zwierząt na inne infekcje oraz zahamowaniem ich wzrostu (Alexander, 2003). W związku z tym wciąż poszukuje się nowych metod walki z wirusem NDV. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie antyoksydantów – związków chroniących organizm przed szkodliwym działaniem wolnych rodników oraz wspomagających jego status immunologiczny. Dostępna literatura dowodzi bowiem, że przeciwutleniacze mogą stanowić barierę ochroną także przed innymi czynnikami chorobotwórczymi, m.in. wirusami (Beck, 2001; Berardi i in., 2009). Wśród antyoksydantów cieszących się szczególnym zainteresowaniem jako potencjalne środki walki z wirusem NDV wymienia się mi.in. witaminę E (tokoferol), resweratrol oraz koenzym Q10 (Nutrition i Health, 2006).

Dotychczas przeprowadzone badania obejmowały analizę wpływu poszczególnych przeciwutleniaczy występujących wyłącznie w formie odrębnych preparatów na rozwój wirusów w zarodkach ptaków (Beck, 2001; Berardi i in., 2009). Brak jest jednak doniesień dotyczących jednoczesnego zastosowania wyżej wymienionych przeciwutleniaczy w formie mieszanki. Założono jednak, że zastosowanie preparatu stanowiącego mieszaninę różnych antyoksydantów może korzystnie modyfikować rozwój patogennych wirusów w organizmie.

Celem pracy była ocena wpływu koenzymu Q10, resweratrolu oraz RRR-d-alfa-tokoferolu zastosowanych w postaci kompleksu antyoksydacyjnego na namnażanie się wirusa NDV w kurzych zarodkach oraz status oksydoredukcyjny żółtka inkubowanych jaj.

Materiał i metody

Badanie in ovo przeprowadzono na 240 jajach kurzych inkubowanych uprzednio przez 8 dni w temperaturze 37°C. Czynnik doświadczalny stanowił wirus NDV (ang. *Newcastle disease virus*, rzekomy pomór drobiu) oraz kompleks antyoksydacyjny przygotowany z 98% koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 1: 1: 1 (A1) oraz w proporcji 5: 3: 2 (A2). Wyjściowe stężenie kompleksu antyoksydacyjnego wynosiło 30 µg/ml. Test przeprowadzono według schematu przedstawionego w tabeli 1.

Tabela 1. Schemat doświadczenia
Table 1. Scheme of the experiment

Czynnik doświadczalny *Experimental factor*	Zarodki zdrowe (Z) (n=120) *Healthy embryos (Z) (n=120)*			Zarodki zakażone (N) (n=120) *Infected embryos (N) (n=120)*		
	Z (n=40)	Z-A1 (n=40)	Z-A2 (n=40)	N (n=40)	N-A1 (n=40)	N-A2 (n=40)
NDV	-	-	-	+	+	+
A1	-	+	-	-	+	-
A2	-	-	+	-	-	+

Ocena namnażania się wirusa NDV w zarodkach kurzych

Ocenę namnażania się wirusa NDV w kurzych zarodkach przeprowadzono zgodnie z metodą zaproponowaną przez Kandefer-Szerszeń (1997). Jaja przeznaczone do testu (n=240) podzielono na trzy równe grupy, a następnie prześwietlono je i oznaczono granicę komory powietrznej oraz położenie zarodka. Po zdezynfekowaniu skorupki 70% alkoholem etylowym wywiercono w niej dwa otwory – jeden nad komorą powietrzną, drugi po przeciwnej stronie zarodka. Po ponownej dezynfekcji do płynu omoczniowego przygotowanych zarodków (N-A1, N-A2) wprowadzono za pomocą iniekcji przez otwór z boku jaja 100 µl odpowiednio kompleksu antyoksydacyjnego A1 lub A2. Grupa kontrolna (N) nie otrzymywała żadnego dodatku doświadczalnego. Dodatkowo, do płynu omoczniowego połowy zarodków z każdej grupy doświadczalnej wprowadzono poprzez iniekcję 100 µl wirusa NDV (Z, Z-A1, Z-A2). Po wprowadzeniu czynników doświadczalnych otwór zaklejono za pomocą ciekłej parafiny. Następnie wszystkie jaja inkubowano w temp. 37°C przez okres 24 h, 48 h lub 72 h. Po upływie określonego czasu jaja odkażono 70% alkoholem etylowym i usunięto skorupki tuż nad obserwowaną linią komory powietrznej. Jałową pęsetą przerwano błonę skorupkową i kosmówko-omoczniową. Pobrano płyn omoczniowy do analiz mikroskopowych. Określono także miano wirusa NDV w płynie omoczniowym z wykorzystaniem metody Reeda i Muencha (1938). W tym celu na płytkę 96-dołkową wprowadzono ciągłą linię komórkową fibroblastów L 929 zawieszoną w płynie wzrostowym MEM (po 50 µl). W celu zmniejszenia błędu wyniku wykorzystano cztery obiekty doświadczalne do każdego pobranego płynu omoczniowego, tj. każde rozcieńczenie wykonano w czterech powtórzeniach. Ponadto, wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-7} dla płynu omoczniowego (pobierano po 50 µl) metodą seryjnych rozcieńczeń. Rozcieńczenia wykonano dla płynu omoczniowego testowanych grup jaj (Z-A1, Z-A2, N, N-A1, N-A2). Zarodki przeniesiono następnie na płytki Petriego i obserwowano zmiany makroskopowe w wyniku zakażenia NDV kurzych zarodków w porównaniu do zarodków kontrolnych (zdrowych).

Ocena statusu oksydoredukcyjnego żółtka jaj

Po 120 h inkubacji z każdego jaja Z, Z-A1, Z-A2, N, N-A1, N-A2 pobrano po 6 próbek żółtka, z których przygotowano homogenaty niezbędne do przeprowadzenia analiz wskaźników statusu oksydoredukcyjnego.

W homogenatach żółtka oznaczono zawartość nadtlenków lipidowych (LOOH) zgodnie z Gay i Gębicki (2000) i dialdehydu malonowego według metody Botsoglou i in. (1994). Ponadto,

w przygotowanych próbach oznaczono aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), wykorzystując metodę adrenalinową zaproponowaną przez Misra w: Greenwald (1985) przy długości fali 320 nm. Metodę zmodyfikowano, by uzyskać większą selektywność przejściowych produktów reakcji przy tej długości światła. Przeprowadzone analizy obejmowały także oznaczenie aktywności katalazy (CAT) zgodnie z Bartoszem (2004).

Analiza statystyczna

Wyniki badań analizowano statystycznie przy użyciu programu Statistica Ver 5.1.G (Stat, Inc. 1997). Dla wszystkich analizowanych zmiennych zależnych (status oksydoredukcyjny) przeprowadzono analizę wariancji ANOVA w planie dwuczynnikowym.

Wyniki i ich omówienie

Na podstawie wyników badań wstępnych, mających na celu określenie wpływu kompleksu antyoksydacyjnego na komórki płynu omoczniowego (tab. 2 i 3) stwierdzono, że kompleks ten nie wpływa negatywnie na komórki. Nie odnotowano bowiem lizy komórek pod wpływem zastosowanego preparatu, a wręcz przeciwnie – zauważono, że zwiększa on gęstość komórek po 48 h inkubacji. Uzyskane wyniki sugerują, że analizowany kompleks doświadczalny stymuluje namnażanie komórek.

Dane literaturowe potwierdzają, że naturalne antyoksydanty nie oddziałują negatywnie na komórki (Beck, 2001; Berardi i in., 2009). Co więcej, dzięki specyficznym właściwościom wspomagają pracę układu odpornościowego i stanowią skuteczną ochronę w walce z wirusami.

Dane określające wpływ wirusa NDV oraz kompleksów antyoksydacyjnych A1 i A2 na komórki płynu omoczniowego zestawiono w tabelach 4–6.

Tabela 2. Odczyt wyników wpływu kompleksu antyoksydacyjnego A1 oraz A2 na komórki płynu omoczniowego po 24-godzinnej inkubacji

Table 2. Results of the effect of antioxidant complex A1 and A2 on allantoic fluid cells after 24 h incubation

Rozcieńczenie *Dilution rate*	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2
10^{-1}	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-	-

A1 – kompleks antyoksydacyjny koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 1: 1: 1.
A1 – antioxidant complex of coenzyme Q10, 98% RRR-d-alpha-tocopherol and 98% resveratrol in a 1: 1: 1 ratio.
A2 – kompleks antyoksydacyjny koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 5: 3: 2.
A2 – antioxidant complex of coenzyme Q10, 98% RRR-d-alpha-tocopherol and 98% resveratrol in a 5: 3: 2 ratio.

Tabela 3. Odczyt wyników wpływu kompleksu antyoksydacyjnego A1 oraz A2 na komórki płynu omoczniowego po 48-godzinnej inkubacji

Table 3. Results of the effect of antioxidant complex A1 and A2 on allantoic fluid cells after 48 h incubation

Rozcieńczenie Dilution rate	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2
10^{-1}	+	+	+	+	-*	-*	-*	-*
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-	-

* Zwiększona gęstość komórki – *Increased cell density.*
A1 – kompleks antyoksydacyjny koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 1: 1: 1.
A1 – antioxidant complex of coenzyme Q10, 98% RRR-d-alpha-tocopherol and 98% resveratrol in a 1: 1: 1 ratio.
A2 – kompleks antyoksydacyjny koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 5: 3: 2.
A2 – antioxidant complex of coenzyme Q10, 98% RRR-d-alpha-tocopherol and 98% resveratrol in a 5: 3: 2 ratio.

Tabela 4. Odczyt wyników wpływu kompleksu antyoksydacyjnego i wirusa NDV na komórki płynu omoczniowego po 48-godzinnej inkubacji
Table 4. Results of the effect of antioxidant complex and NDV virus on allantoic fluid cells after 48 h incubation

Rozcieńczenie *Dilution rate*	N	N	N	N	N-A1	N-A1	N-A1	N-A1	N-A2	N-A2	G.N-2	N-A2	
10^{-1}	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	kontrola 1 bez zmian *control 1 no change*
10^{-2}	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A1 *control N-A1*
10^{-3}	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A1 *control N-A1*
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A2 *control N-A2*
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A2 *control N-A2*
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MEM kom. bez zmian *MEM cells no change*
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MEM kom. bez zmian *MEM cells no change*
Wynik miareczkowania *Titration result*	$4420000=2*10^{3,00+0,45}CCID_{50}/ml$				$4000000=2*10^{1,50+0,32}CCID_{50}/ml$				$4000000=2*10^{1,50+0,32}CCID_{50}/ml$				

N – zarodki zakażone wirusem NDV – *embryos infected with NDV virus.*
N-A1 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A1 – *embryos infected with NDV virus and supplemented with A1 antioxidant complex.*
N-A2 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A2 – *embryos infected with NDV virus and supplemented with A2 antioxidant complex.*

Tabela 5. Odczyt wyników wpływu kompleksu antyoksydacyjnego i wirusa NDV na komórki płynu omoczniowego po 72-godzinnej inkubacji
Table 5. Results of the effect of antioxidant complex and NDV virus on allantoic fluid cells after 72 h incubation

Rozcieńczenie *Dilution rate*	N	N	N	N	N-A1	N-A1	N-A1	N-A1	N-A2	N-A2	N-A2	N-A2	
10^{-1}	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	kontrola 1 bez zmian *control 1 no change*
10^{-2}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A1 *control N-A1*
10^{-3}	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A1 *control N-A1*
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A2 *control N-A2*
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A2 *control N-A2*
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MEM kom. bez zmian *MEM cells no change*
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MEM kom. bez zmian *MEM cells no change*
Wynik miareczkowania *Titration result*	$4440000=2*10^{3,50+0,32}CCID_{50}/ml$				$4000000=2*10^{1,50+0,32}CCID_{50}/ml$				$4000000=2*10^{1,50+0,32}CCID_{50}/ml$				

N – zarodki zakażone wirusem NDV – *embryos infected with NDV virus*
N-A1 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A1 – *embryos infected with NDV virus and supplemented with A1 antioxidant complex*
N-A2 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A2 – *embryos infected with NDV virus and supplemented with A2 antioxidant complex.*

Tabela 6. Odczyt wyników wpływu kompleksu antyoksydacyjnego i wirusa NDV na komórki płynu omoczniowego po 120 godzinach inkubacji
Table 6. Results of the effect of antioxidant complex and NDV virus on allantoic fluid cells after 120 h incubation

Rozcieńczenie *Dilution rate*	N	N	N	N	N-A1	N-A1	N-A1	N-A1	N-A2	N-A2	N-A2	N-A2	
10^{-1}	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	kontrola 1 bez zmian *control 1* *no change*
10^{-2}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A1 *control N-A1*
10^{-3}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A1 *control N-A1*
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A2 *control N-A2*
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kontrola N-A2 *control N-A2*
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MEM kom. bez zmian *MEM* *cells no change*
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MEM kom. bez zmian *MEM* *cells no change*
Wynik miareczkowania *Titration result*	$4440000=2*10^{3,50+0,32}CCID_{50}/ml$				$4000000=2*10^{1,50+0,32}CCID_{50}/ml$				$4000000=2*10^{1,50+0,32}CCID_{50}/ml$				

N – zarodki zakażone wirusem NDV – *embryos infected with NDV virus.*
N-A1 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A1 – *embryos infected with NDV virus and supplemented with A1 antioxidant complex.*
N-A2 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A2 – *embryos infected with NDV virus and supplemented with A2 antioxidant complex.*

Stwierdzono, że dodatek kompleksów antyoksydacyjnych A1 i A2 do zakażonych wirusem NDV 8-dniowych zarodków kurzych hamuje namnażanie się patogenu. Powyższe efekty widoczne były już po 48 h inkubacji (tab. 4). W zarodkach zakażonych wirusem NDV (N) obserwowano bowiem lizę komórek jeszcze w rozcieńczeniu $10^{-3,}$ a liza komórek zakażonych wirusem NDV w obecności kompleksów antyoksydacyjnych (N-A1 i N-A2) była widoczna jedynie przy rozcieńczeniu 10^{-1}.

Efekt hamowania namnażania się wirusa NDV w kurzych zarodkach przez kompleks antyoksydacyjny wyrażał się także w postaci niższego miana wirusa (tab. 4). Miano wirusa zakażonych zarodków wynosiło 100 000 CCID50 w 1 ml, natomiast miano wirusa zakażonych jaj w obecności kompleksów antyoksydacyjnych było znacząco niższe – 31 620 CCID50 w 1 ml. Podobne rezultaty odnotowano po 72 h i 120 h inkubacji. 72- i 120-godzinna inkubacja potwierdziła zdolność badanych kompleksów antyoksydacyjnych do hamowania namnażania się wirusa NDV. Miano wirusa płynu omoczniowego po 72 i 120 h inkubacji zakażonych NDV zarodków wynosiło 3 162 000 CCID50/ml, natomiast miano wirusa w płynie omoczniowym zakażonych NDV zarodków w obecności kompleksów antyoksydacyjnych – 31 620 CCID50/ml. Konfrontacja i porównanie uzyskanych wyników z badań własnych są utrudnione z uwagi na brak podobnych badań w dostępnej literaturze krajowej i zagranicznej. Jednak jak podają Glickman i in. (1988), antyoksydanty mogą wykazywać zdolność hamowania rozwoju wirusów.

Obumarłe na skutek zakażenia wirusem NDV zarodki (N) były zaczerwienione, pokryte wybroczynami na grzbiecie i kończynach. Na czaszkach stwierdzono dość duże wylewy krwi. Komórki płynu omoczniowego pobrane z zakażonego zarodka były wyraźnie zniszczone przez wirusa. Pobrany płyn omoczniowy był mętny. Z kolei, zarodki zakażone wirusem NDV (N-A1 i N-A2) w obecności kompleksów polifenolowych A1 i A2 nie wykazywały tak intensywnych objawów zakażenia. Porównanie pod mikroskopem wyglądu zdrowych zarodków kurzych (Z-A1 i Z-A2) inkubowanych w obecności wyłącznie kompleksów polifenolowych w odniesieniu do zarodków kurzych zakażonych wirusem NDV inkubowanych w obecności kompleksów polifenolowych (N-A1 i N-A2) wykazało, że komórki zarodków kurzych inkubowanych w obecności wyłącznie kompleksów polifenolowych uległy znacznie mniejszemu zniszczeniu, wręcz przeciwnie – powiększyły swoją gęstość. Jest to prawdopodobnie wynikiem pozytywnego wpływu kompleksu polifenolowego na proces namnażania zdrowych komórek. Z kolei, komórki zarodków zakażone wirusem NDV w obecności kompleksu polifenolowego (N-A1 i N-A2) wykazywały znacznie mniejsze objawy zniszczenia niż komórki zarodków zakażonych NDV (N).

Wyniki dotyczące kształtowania się wskaźników statusu oksydoredukcyjnego w zapłodnionych zarodkach kurzych zakażonych wirusem NDV w obecności kompleksów polifenolowych zamieszczono w tabelach 7 i 8.

W żółtku zapłodnionych jaj zakażonych wirusem NDV (N) stwierdzono istotny w odniesieniu do żółtek zdrowych zarodków (Z) wzrost poziomu produktów peroksydacji: LOOH (nadtlenków) oraz MDA (dialdehydu malonowego). Świadczy to o stresie oksydacyjnym spowodowanym zakażeniem wirusowym. W żółtku jaja N odnotowano także istotny wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych: SOD (dysmutazy ponadtlenkowej) i CAT (katalazy). Istotnie niższy niż w żółtkach N poziom produktów utleniania (LOOH i MDA) oraz niższą aktywność enzymów (SOD i CAT) odnotowano w żółtkach zakażonych wirusem NDV w obecności kompleksów antyoksydacyjnych. Subbaiah i in. (2011), prowadząc badania na kurczętach zakażonych wirusem NDV także odnotowali efekt zwiększonej oksydacji (stres oksydacyjny). Autorzy badań zaobserwowali bowiem znaczący wzrost stężenia MDA w mózgu i wątrobie u kurcząt zarażonych wirusem NDV w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei, w badanych tkankach mózgu i wątroby aktywność enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej oraz transferazy-S-glutationowej uległa istotnemu obniżeniu w odniesieniu do wartości tych enzymów w grupie kontrolnej. Ci sami autorzy (Subbaiah i in., 2011), podając zakażonym wirusem NDV kurczętom dodatek do paszy witaminy E odnotowali zmniejszone nasilenie

procesów oksydacyjnych, co wyrażało się niższą zawartością produktów utleniania (MDA) oraz wyższą zawartością enzymatycznych przeciwutleniaczy w tkankach mózgu i wątroby w odniesieniu do zakażonych tkanek. Prowadzone przez Subbaiah i in. (2011) badania histopatologiczne wykazały także, że w efekcie zakażenia wirusem NDV obserwuje się zmiany w hepatocytach, mózgu i sercu. Zmian takich nie obserwowano natomiast u kurcząt, którym podawano witaminę E. Dodatek witaminy stymuluje odpowiedź immunologiczną zakażonych kurcząt poprzez szybki wzrost odpowiednich przeciwciał przeciwko wirusowi NDV oraz wpływa na pamięć immunologiczną. Odkrycie to stanowi podstawę roli stresu oksydacyjnego w patogenezie NDV oraz efekt terapeutyczny przeciwutleniaczy (Subbaiah i in., 2015).

Tabela 7. Poziom wskaźników oksydoredukcyjnych w żółtkach zapłodnionych jaj zarażonych wirusem NDV po 120 godzinach inkubacji

Table 7. The level of oxidative parameters in fertilized yolk of eggs infected with NDV after 120 h incubation

Parametr *Parameter*	Z	Z-A1	Z-A2	N	N-A1	N-A2
LOOH nmol•mg^{-1}	4,23 b ± 0,33	4,13 b ± 0,37	4,01 b ± 0,15	7,59 a ± 1,98	3,43 c ± 0,57	3,47 c ± 0,17
MDA nmol•mg^{-1}	1,05 bc ± 0,33	0,72 c ± 0,08	0,99 c ± 0,22	2,40 a ± 0,15	1,59 b ± 0,06	1,62 b ± 0,03
SOD U•mg^{-1}	22,83 e ± 5,37	15,92 f ± 1,31	17,98 ef ± 8,85	626,7 a ± 65,4	138,4 d ± 28,9	226,8 c ± 28,5
CAT U•mg^{-1}	33,1 cd ± 6,82	22,4 e ± 7,37	27,85 d ± 6,85	69,47 a ± 5,79	53,29 b ± 1,89	48,82 c ± 7

Z – zarodki zdrowe, Z-A1 – zarodki zdrowe otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A1, Z-A2 – zarodki zdrowe otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A2, N – zarodki zakażone wirusem NDV, N-A1 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A1, N-A2 – zarodki zakażone wirusem NDV otrzymujące dodatek kompleksu antyoksydacyjnego A2.

Z – healthy embryos, Z-A1 – healthy embryos supplemented with A1 antioxidant complex, Z-A2 – healthy embryos supplemented with A2 antioxidant complex, N – embryos infected with NDV virus; N-A1 – embryos infected with NDV virus and supplemented with A1 antioxidant complex; N-A2 – embryos infected with NDV virus and supplemented with A2 antioxidant complex.

a, b, c… – średnie różniące się istotnie na poziomie istotności P≤ 0,05 – *means differ significantly at P≤ 0.05.*

Tabela 8. Analiza statystyczna

Table 8. Statistical analysis

Parametr *Parameter*	Efekt czynników głównych - *Effect of main factors*			Interakcja - *Interaction*	
	A1	A2	N	A1xN	A2xN
LOOH	ns	ns	**	*	*
MDA	ns	ns	**	**	**
SOD	*	ns	*	*	*
CAT	*	**	*	**	*

A1 – kompleks antyoksydacyjny koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 1: 1: 1.

A1 – antioxidant complex of coenzyme Q10, 98% RRR-d-alpha-tocopherol and 98% resveratrol in a 1: 1: 1 ratio.

A2 – kompleks antyoksydacyjny koenzymu Q10, 98% RRR-d-alfa-tokoferolu oraz 98% resweratrolu w proporcji 5: 3: 2.

A2 – antioxidant complex of coenzyme Q10, 98% RRR-d-alpha-tocopherol and 98% resveratrol in a 5: 3: 2 ratio.

N – zakażenie wirusem NDV; * istotność P≤0,01; ** istotność P≤0,05.

*N – infected with NDV virus; * significant at P≤0.01; ** significant at P≤0.05.*

W żółtku zapłodnionych jaj zakażonych wirusem NDV (N) stwierdzono istotny w odniesieniu do żółtek zdrowych zarodków (Z) wzrost poziomu produktów peroksydacji: LOOH (nadtlenków) oraz MDA (dialdehydu malonowego). Świadczy to o stresie oksydacyjnym spowodowanym zakażeniem wirusowym. W żółtku jaja N odnotowano także istotny wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych: SOD (dysmutazy ponadtlenkowej) i CAT (katalazy). Istotnie niższy niż w żółtkach N poziom produktów utleniania (LOOH i MDA) oraz niższą aktywność enzymów (SOD i CAT) odnotowano w żółtkach zakażonych wirusem NDV w obecności kompleksów antyoksydacyjnych. Subbaiah i in. (2011), prowadząc badania na kurczętach zakażonych wirusem NDV także odnotowali efekt zwiększonej oksydacji (stres oksydacyjny). Autorzy badań zaobserwowali bowiem znaczący wzrost stężenia MDA w mózgu i wątrobie u kurcząt zarażonych wirusem NDV w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei, w badanych tkankach mózgu i wątroby aktywność enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej oraz transferazy-S-glutationowej uległa istotnemu obniżeniu w odniesieniu do wartości tych enzymów w grupie kontrolnej. Z kolei, ci sami autorzy (Subbaiah i in., 2011), podając zakażonym wirusem NDV kurczętom dodatek do paszy witaminy E odnotowali zmniejszone nasilenie procesów oksydacyjnych, co wyrażało się niższą zawartością produktów utleniania (MDA) oraz wyższą zawartością enzymatycznych przeciwutleniaczy w tkankach mózgu i wątroby w odniesieniu do zakażonych tkanek. Prowadzone przez Subbaiah i in. (2011) badania histopatologiczne wykazały także, że w efekcie zakażenia wirusem NDV obserwuje się zmiany w hepatocytach, mózgu i sercu. Zmian takich nie obserwowano natomiast u kurcząt, którym podawano witaminę E. Dodatek witaminy stymuluje odpowiedź immunologiczną zakażonych kurcząt poprzez szybki wzrost odpowiednich przeciwciał przeciwko wirusowi NDV oraz wpływa na pamięć immunologiczną. Odkrycie to stanowi podstawę roli stresu oksydacyjnego w patogenezie NDV oraz efekt terapeutyczny przeciwutleniaczy (Subbaiah i in., 2015).

Prowadzono również badania na zakażonych NDV kurczętach, którym podawano koenzym Q i resweratrol. Wyniki tych badań wykazały, że związki te znacznie poprawiają funkcje układu odpornościowego i zmniejszają objawy zakażenia wirusem NDV (Mezes i Bulogh, 2011). Z uwagi na to, że podjęta tematyka badawcza nie była przedmiotem badań wielu autorów, odniesienie wyników badań własnych jest utrudnione.

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że poddany badaniom kompleks antyoksydacyjny wykazuje zdolność do hamowania namnażania wirusa NDV w kurzych zarodkach. Co więcej, patologii zakażenia wirusem NDV kurzych zarodków towarzyszy silny stres oksydacyjny, czego efektem jest wzrost zawartości końcowego produktu peroksydacji (MDA) oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD i CAT). Stwierdzono jednak, że stres ten można ograniczyć poprzez zastosowanie dodatku kompleksu antyoksydantów (koenzym Q10, + RRR-d-alfa-tokoferol + resweratrol).

Zastosowanie kompleksu antyoksydacyjnego (koenzym Q10 + RRR-d-alfa-tokoferol + resweratrol), skomponowanego w proporcji 1: 1: 1 i 5: 3: 2 wydaje się więc być obiecujące jako dodatek stosowany w profilaktyce lub wspomagający leczenie zakażeń wirusem NDV kurzych zarodków. Niemniej jednak, badania przeprowadzone wyłącznie *in vitro* wymagają kontynuacji i potwierdzenia wyników w badaniach *in vivo*.

Literatura

Alexander D.J. (2000). Newcastle disease and other avian Paramyxoviruses. Rev. Sci. Tech., 2: 443–462.

Alexander D.J. (2003). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In: Viral Diseases, pp. 63–87.

Bartosz G. (2004). Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.

Beard C.W., Hanson R.P. (1984). Newcastle disease. Hofstad M.S., Barnes H.J., Calnek B.W. Reid W.M. Yoder H.W. (eds), Dis. Poultry, pp. 450–470.

Beck M.A. (2001). Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity. J. Am. Coll.

Nutr., 20: 384S–388S.
Berardi V., Ricci F., Castelli M., Galati G., Risuleo G. (2009). Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use. J. Exp. Clin. Cancer Res., 28: 96–103.
Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos V.N., Mantis A.J., Trakatellis A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. J. Agric. Food Chem., 42: 1931–1937.
Boven M., Bouma A., Fabri T.H.F., Katsma E., Hartog L., Koch G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian Pathol., 37: 1–5.
Gay C., Gębicki J.M. (2000). A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. Anal. Biochem., 284: 217–220.
Glickman R.L., Syddall R.J., Iorio R.M., Sheehan J.P., Bratt M.A. (1988). Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. J. Virol., 62: 354–356.
Greenwald R.A. (1985). CRC Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press Boca Raton. In: Bartosz G., 2004. Second face of oxygen, PWN, Warszawa.
Kandefer-Szerszeń M. (1997). Ćwiczenia z wirusologii. Wyd. UMC-S, Lublin.
Mezes M., Bulogh K. (2011). Free radicals and antioxidants in avian diseases. In: Oxidative stress in applied basic research and clinical practice, pp. 175–190.
Nutrition and Health (2006). Calivita International, 4–5 (36).
Orajaka L.J.E., Adene D.F., Anene B.M., Onuoha E.A. (1999). Seroprevalence of Newcastle disease in local chickens from Southeast derived savannah zone of Nigeria. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 52: 185–188.
Reed L.J., Muench H. (1938). A simple metod of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg., 27: 493–497.
Seal B.S., King D.J., Sellers H.S. (2000). The avian response to Newcastle disease virus. Dev. Comp. Immunol., 24: 257–268.
Subbaiah K.C., Raniprameela D., Visweswari G., Rajendra W., Lokanatha V. (2011). Perturbations in the antioxidant metabolism during Newcastle disease virus (NDV) infection in chicken: protective role of vitamin E. Naturwissenschaften, 98: 1019–1026.
Subbaiah K.C., Valluru L., Rajendra W., Ramamurthy C., Thirunavukkarusu C., Subramanyam R. (2015). Newcastle disease virus (NDV) induces protein oxidation and nitration in brain and liver of chicken: Ameliorative effect of vitamin E. Int. J. Biochem. Cell Biol., 64: 97–106.

IN OVO STUDY ON THE EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON NDV PROLIFERATION IN CHICKEN EMBRYOS

Summary

The aim of the study was to evaluate the effects of coenzyme Q10, resveratrol and RRR-d-alpha-tocopherol used as an antioxidant complex on NDV proliferation in chicken embryos and the antioxidant status of yolk in incubated eggs.

The *in vitro* study was conducted on 240 fertilized eggs which were divided into 3 equals groups. The first group did not receive any experimental supplement. Groups 2 and 3 received 100 µl antioxidant complex containing coenzyme Q10, RRR-d-alpha-tocopherol and resveratrol respectively in a 1: 1: 1 (A1) or 5: 3: 2 (A2) ratio. In addition to the allantoic fluid, half of the embryos from each group were injected with 100 µl NDV. After 24, 48 or 72 h incubation, the NDV proliferation rate in chicken embryos was evaluated and the virus profile in the allantoic fluid was determined. The yolks, which were incubated for 120 h, contained lipid hyperoxides, malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase.

The results indicate that the tested antioxidant complex has the ability to inhibit NDV proliferation in chicken embryos. The pathology of NDV infection is accompanied by oxidative stress, resulting in increased content of MDA and SOD and CAT activity. However, it has been found that stress may be reduced by the addition of the antioxidant complex.

Key words: NDV, chickens, embryo, antioxidants