

TEMPO PRACY SERCA ZARODKÓW WYBRANYCH GATUNKÓW PTAKÓW DOMOWYCH

Krzysztof Pawlak, Marcin Lis, Barbara Tombarkiewicz,
Jerzy Niedziółka

Uniwersytet Rolniczy, Kraków

Streszczenie. Celem podjętych badań była ocena tempa pracy serca zarodków wybranych gatunków ptaków domowych: kura domowa, przepiórka japońska, perlica, kaczka piżmowa oraz gęś biała włoska w trakcie rozwoju embrionalnego. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem metody balistokardiografii bezkontaktowej. W początkowym okresie badań (9. 10. doba inkubacji) widoczny był spadek tempa pracy serca badanych zarodków. Wyjątek stanowi przepiórka, u której w tym okresie obserwowano wzrost liczby skurczów występujących w jednostce czasu. W końcowym okresie inkubacji zaobserwowano tendencje spadkowe w tempie pracy serca zarodków wszystkich badanych gatunków. W trakcie badań stwierdzono, że w dniach poprzedzających śmierć zarodka występowały duże zakłócenia w zapisach balistokardiograficznych.

Słowa kluczowe: balistokardiografia, embriogeneza, serce, zarodek ptasi

WSTĘP

Zarodek ptasi, rozwijając się poza organizmem matki, charakteryzuje się wysoką wrażliwością na działanie czynników zewnętrznych. W chowie i hodowli drobiu okres inkubacji jest okresem newralgicznym i tylko jego prawidłowy przebieg gwarantuje sukces podczas dalszych etapów użytkowania ptaków [Borzemska i Malec 1986]. Błędy popełnione przez producentów jaj wylęgowych oraz pracowników wylęgarni zawsze wiążą się ze znacznymi stratami finansowymi. Równocześnie specyfika rozwoju embrionalnego sprawia, że zarodki ptasie znajdują szerokie zastosowanie jako model biologiczny w eksperymentach naukowych [Krull 2004, Han i in. 2005].

W badaniach nad czynnikami wpływającymi na rozwój zarodka ptasiego bardzo duże znaczenie ma możliwość bezinwazyjnego śledzenia przebiegu embriogenezy. Próby użycia w tym celu ultrasonografii czy udoskonalonych metod prześwietlania skorupy nie przyniosły zadowalających rezultatów, z racji umiejscowienia ptasiego zarodka wewnątrz wapiennej skorupy [Haque i in. 1994].

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr inż. Pawlak Krzysztof, Katedra Hodowli Drobiu Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny, Uniwersytet Rolniczy, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, e-mail: rzpawlak@cyf-kr.edu.pl

Jednym z pierwszych przejawów czynności organizmu rozwijającego się w jaju jest praca serca. Wydaje się więc, że możliwość rejestracji pracy tego organu podczas embriogenezy może ułatwić kontrolowanie przebiegu rozwoju zarodkowego ptaków. Jak donoszą Szymański i in. [2002] oraz Aubert i in. [2004], jedną z najlepszych metod rejestracji pracy serca jest metoda balistokardiografii bezkontaktowej. Metoda ta opiera się na rejestracji drgań ciała spowodowanych mechaniczną pracą serca i pozwala na uchwycenie zmian zachodzących w pracy tego organu w trakcie rozwoju [Szymański i in. 2002]. Dotychczasowe badania wykonywane na zarodkach kurzych dowiodły, że metoda ta charakteryzuje się dużą czułością i dokładnością [Pawlak i Niedziółka 2004].

Większość artykułów opisujących pracę serca zarodków ptasich dotyczy zarodków kurzych [Antoni i Diliger 1981, Szymański i in. 2002, Khandoker i in. 2003, Aubert i in. 2004, Pawlak i Niedziółka 2004]. W dostępnej literaturze istnieją tylko pojedyncze prace opisujące tempo pracy serca innych gatunków ptaków domowych, a przedstawione w nich badania często dotyczą końcowego okresu inkubacji [Suzuki i in. 1989, Tazawa i in. 1991].

Celem podjętych badań była ocena tempa pracy serca zarodków wybranych gatunków ptaków domowych (kury domowej, przepiórki japońskiej, perlicy, kaczki piżmowej oraz gęsi białej włoskiej) podczas ich rozwoju embrionalnego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny użyty w badaniach stanowiły jaja wylęgowe ferm reprodukcyjnych:

- 50 jaj kaczki piżmowej,
- 50 jaj kurzych Hy-Line (kura domowa typ nieśny),
- 50 jaj kurzych Ross 308 (kura domowa typ mięsny),
- 50 jaj gęsi białej włoskiej,
- 50 jaj perlicy,
- 50 jaj przepiórki japońskiej.

Lęgi przeprowadzono w inkubatorach laboratoryjnych typu Masalles 65 DIGIT, zgodnie z ogólnie przyjętymi normami specyficznymi dla każdego gatunku.

Jednym z najsilniejszych generatorów pola elektrycznego w organizmie jest serce. Potencjały czynnościowe powstające wewnątrz organizmu są źródłem zmiennych pól elektrycznych, docierających do powierzchni ciała i również do skorupy jaja [Keef i in. 1970, Williams i in. 1997].

W metodzie zaproponowanej przez Janowskiego i Szymańskiego [2000] właściwość ta została wykorzystana do bezkontaktowego pomiaru pracy serca zarodka kurzego. Skorupa jaja z ładunkiem pochodzącym z pracy serca jest jedną z okładek kondensatora. Drugą okładkę stanowi antena odbiorcza aparatury pomiarowej. Praca serca zarodka ptasiego powoduje minimalne ruchy całego jaja, w wyniku czego następuje zmiana odległości między okładkami a tym samym zmiana różnicy potencjałów między skorupą a anteną odbiorczą, która jest rejestrowana przez urządzenie pomiarowe. Każdorazowo przed rejestracją pracy serca, w celu kalibracji urządzenia, wykonywany był pomiar kalibrujący za pomocą generatora pola i półkolistej anteny odbiorczej.

Każde jajo po wyjęciu z inkubatora było umieszczane na sprężystej podkładce znajdującej się wewnątrz klatki Faradaya. W celu wyeliminowania stresu termicznego, który miałby niewątpliwie wpływ na pracę serca, powietrze wewnątrz klatki było podgrzewane do temperatury panującej w inkubatorze. Antena odbiorcza umieszczona była 2 mm od skorupy jaja.

Pomiar pracy serca dokonywany był codziennie o tej samej godzinie z zachowaniem kolejności, tzn. pierwsze poddawane było badaniom jajo numer jeden, ostatnie numer pięćdziesiąt. Po przeniesieniu jaja do urządzenia pomiarowego odczekiwano około 4 minuty przed rozpoczęciem pomiarów w celu wyeliminowania zakłóceń spowodowanych zmianą środowiska, jak i samą czynnością przenoszenia jaja z inkubatora [Pawlak i in. 2001, 2002].

Proces samego zapisu pracy serca trwał minutę. W celu upewnienia się czy rejestrowany sygnał faktycznie pochodzi z funkcji życiowych zarodka, a nie jest pochodną różnego rodzaju zakłócających sygnałów, każdego dnia eksperymentu wykonywano pomiar sygnału pochodzącego z niezapłodnionego jaja tego gatunku ptaka, który był aktualnie badany. Procedura pomiarowa była identyczna jak przy jajach z żywymi zarodkami.

Otrzymany sygnał pracy serca był zapisywany na komputerze klasy PC.

Analiza komputerowa pozwalająca na ustalenie tempa pracy serca polegała na obliczeniu obwiedni sygnału za pomocą średniej ruchomej (11 punktów) z modułu zarejestrowanego sygnału zgodnie z poniższym wzorem:

$$Y_i = \frac{1}{11} \sum_{k=i5}^{i5} |y_k|$$

gdzie: y_k – k-ta próbka zarejestrowanego sygnału, Y_i – i-ta próbka nowo utworzonego szeregu czasowego tzw. obwiedni.

W dalszym etapie sygnał poddawany był analizie polegającej na podziale szeregu pomiarowego na 15-sekundowe fragmenty. Z każdego takiego fragmentu danych pomiarowych obliczane było widmo mocy sygnału o zdolności rozdzielczej 0,06 Hz. Do obliczenia widm mocy zastosowano szybki algorytm przekształcenia Fouriera. Widma te zostały zsumowane, aby wyznaczyć średnie widmo mocy z całego pomiaru, co finalnie pozwoliło na ustalenie tempa pracy serca rozwijającego się zarodka w kolejnych dniach rozwoju.

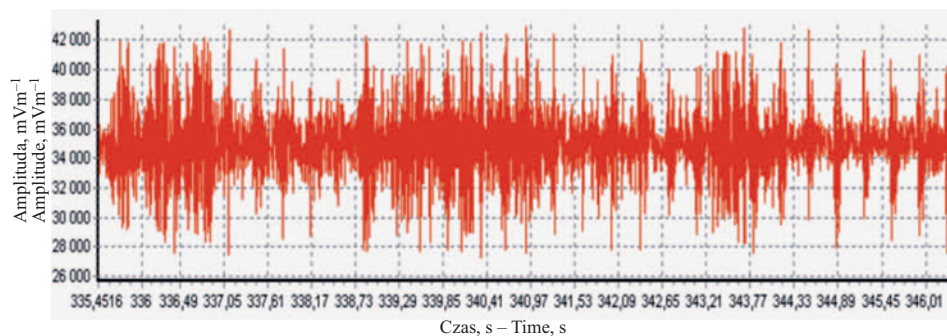
Zgodnie z metodą zaproponowaną przez Borzemska i Malca [1986], począwszy od momentu przekładu jaj z tac lęgowych na tace klujnikowe, kontrolowano przebieg wykluwania się piskląt.

WYNIKI I DISKUSJA

W trakcie trwania całego doświadczenia wykonano 7600 pomiarów balistokardiograficznych. U kaczki piźmowej wykonano 1700 rejestracji (50 jaj przez 34 dni) u kury typu nieśnego, jak i mięsnego po 1050 (50 jaj przez 21 dni), u perlicy 1400 (50 jaj przez 28 dni), u gęsi białej włoskiej 1550 (50 jaj przez 31 dni) i u przepiórki 850 (50 jaj przez 17 dni).

Pomiary balistokardiograficzne wykonywane były od pierwszego dnia inkubacji, jednak przez 6 pierwszych dni nie udało się zarejestrować powtarzalnego sygnału, jaki świad-

czyłby o pracy serca. Pierwsze powtarzalne sygnały zarejestrowano w 7. dobie inkubacji, a u przepiórki w 8. dobie, jednak sygnały te były bardzo słabe, ginęły wśród zakłóceń i nie nadawały się do cyfrowej analizy (rys. 1)

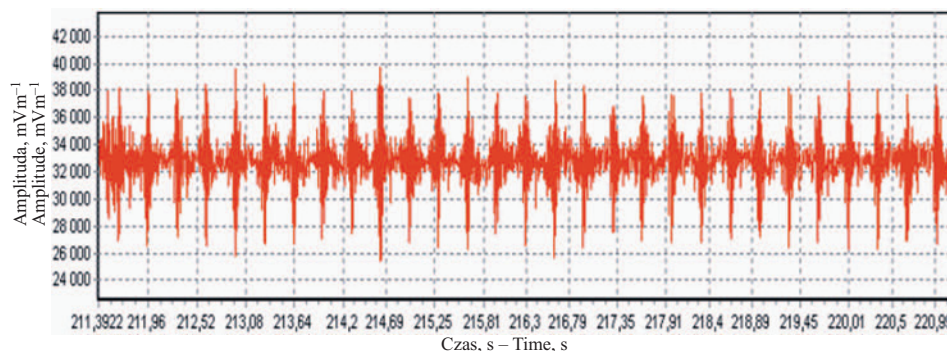


Rys. 1. Sygnał pochodzący od 6-dniowego zarodka kurzego

Fig. 1. Signal obtained from chicken egg with 6-day embryo

Podobne problemy w rejestracji balistokardiogramów u młodszych zarodków ptasich mieli Suzuki i in. [1989] oraz Tazawa i in. [1993].

Od 9. dnia inkubacji (u przepiórki od 10.) sygnał pochodzący z pracy serca był już na tyle silny, że mógł być rejestrowany u wszystkich żywych zarodków (rys. 2). Uzyskane wyniki mogą świadczyć o znaczącym wzroście mocy sygnału, począwszy od 9. dnia inkubacji. Tak znaczący wzrost mocy sygnału jest prawdopodobnie związany z tym, że po 8. dniu inkubacji zarodek wytwarza zewnętrzny układ krążenia w ścianie omocznia, który od 9. dnia rozwoju aż do momentu przejścia na oddychanie płucne pełni funkcję układu oddechowego [Borzemska i Niedziółka 1984].

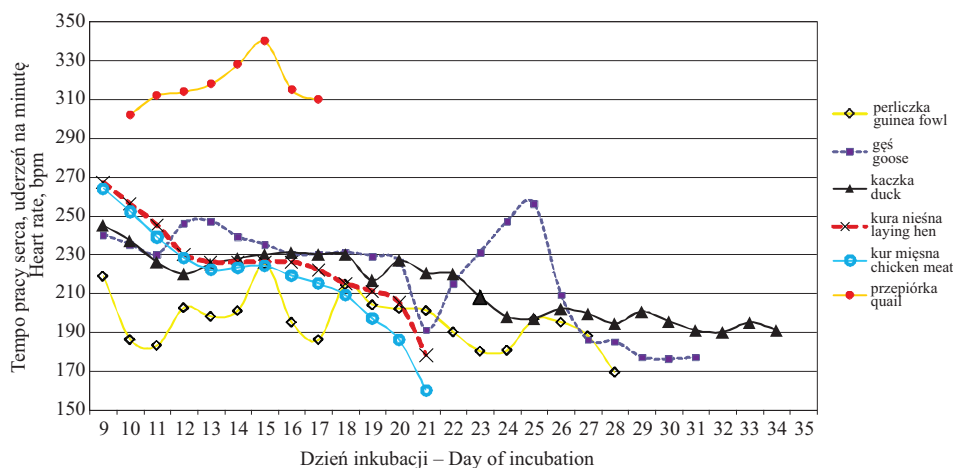


Rys. 2. Balistokardiogram zarodka gęsi – 9. doba inkubacji

Fig. 2. Ballistocardiogram for goose embryo day 9th of incubation

Przeprowadzona analiza wykazała, że najwyższe wartości tempa pracy serca u zarodków kaczych występują w 9. dobie inkubacji (245 uderzeń na minutę), natomiast najniższe w jej końcowym okresie (32. doba – 190 uderzeń na minutę) – rys. 3. W podobnych

badaniach Tazawa i in. [1991] powtarzalny sygnał świadczący o pracy serca uzyskali dopiero w 17. dniu inkubacji. Cytowani autorzy stwierdzili również, że najniższe wartości tempa pracy serca zarodków kaczych są rejestrowane w ostatnim okresie inkubacji.



Rys. 3. Tempo pracy serca zarodków ptasich w kolejnych dniach rozwoju
Fig. 3. Heart rate of avian embryo on subsequent days of development

Podobną tendencję w pracy serca, jak u zarodków kaczych, stwierdzono u zarodków kurzych. Największą częstotliwość pracy serca zarówno u zarodków Hy-Line, jak i Ross 308 stwierdzono w 9. dobie inkubacji (odpowiednio 267 i 264 uderzeń na minutę), natomiast najniższą ostatniego dnia inkubacji (178 i 160 uderzeń na minutę) – rys. 3. Podobne wyniki badań uzyskali Pawlak i Niedziółka [2004]. Ponadto stwierdzono, że średnie tempo pracy serca zarodków Hy-Line było zawsze wyższe niż zarodków Ross 308. Jak wykazały badania Pawlak i Wojtysiak [2004], masa serca zarodków kurzych ma wpływ na tempo jego pracy. Wolniejsze tempo pracy serca zarodków Ross 308 może być związane z większą masą ciała embrionów kur typu mięsnego.

Przeprowadzone obliczenia wykazały, że najwyższe tempo pracy serca u perlic występuje w 15. dobie inkubacji (225 uderzeń na minutę), natomiast najniższe, podobnie jak u zarodków kurzych w ostatniej dobie inkubacji (169 uderzeń na minutę) – rys. 3. W dostępnej literaturze brak jest badań dotyczących pracy serca zarodków tego ptaka.

Dotychczasowe badania dotyczące pracy serca zarodków gęsi obejmowały jedynie gęś chińską i były prowadzone dopiero od 15. doby inkubacji [Tazawa i in. 1991]. Badania dotyczące gęsi białej włoskiej wykazały, że najwyższe tempo pracy serca zostało zarejestrowane 13. dnia inkubacji (247 uderzeń na minutę), a najniższe 30. dnia – 176 uderzeń na minutę (rys. 3). Podobne wartości tempa pracy serca były rejestrowane u zarodków gęsi chińskiej [Tazawa i in. 1991].

Odmienne wyniki uzyskano badając tempo pracy serca zarodków przepiórki. Najwyższe tempo pracy serca u zarodków tego ptaka zanotowano w końcowym okresie inkubacji (15. doba – 340 uderzeń na minutę), a najniższe w 9. dobie inkubacji (302 uderzeń na minutę) – rys. 3.

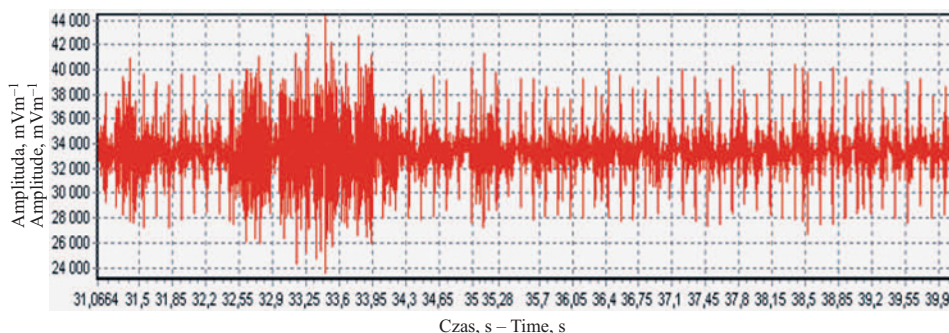
Jak podaje Tazawa i in. [1991], uzyskane wyniki mogą mieć związek z bardzo małą, w porównaniu z innymi badanymi gatunkami, masą zarodka przepiórki japońskiej.

Zestawiając otrzymane wyniki tempa pracy serca wszystkich badanych zarodków ptasich, można zauważyć pewne powtarzające się tendencje (rys. 3). W początkowym okresie inkubacji (9.–10. dzień) widoczny jest spadek tempa pracy serca badanych zarodków. Wyjątek stanowi przepiórka, gdzie w tym okresie obserwowano wzrost liczby skurczów przypadających w jednostce czasu. Podobne spadkowe tendencje w tempie pracy serca zarodków wszystkich badanych gatunków zaobserwowano w końcowym okresie inkubacji.

Jak donoszą Antoni i Dilger [1981], spadek tempa pracy serca w ostatnich dniach inkubacji u zarodków ptasich może być związany z procesem nakłuwania się piskląt, a Khandoker i in. [2003] precyzują, że w związku z procesem wykluwania się, pisklą zżywa więcej tlenu i wytwarza więcej dwutlenku węgla, co może tłumaczyć spadek tempa pracy serca zarodków w końcowym okresie inkubacji.

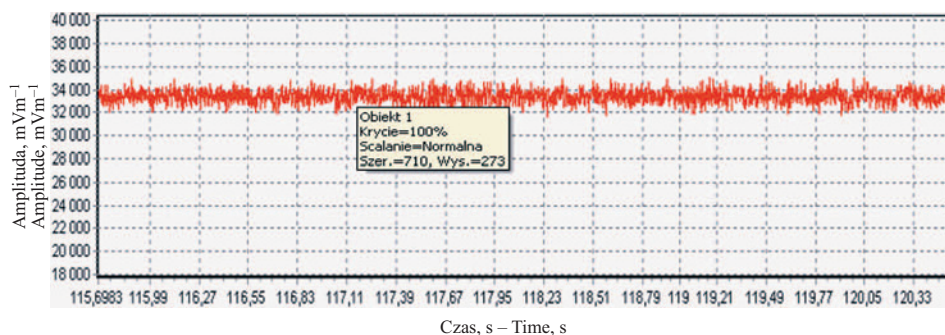
Natomiast Freeman i Misson [1970] oraz Nichelmann i in. [1999] sugerują, że obniżenie tempa pracy serca w końcowym okresie inkubacji może być spowodowane zmniejszającą się efektywnością krążenia omocznioowego, co powoduje wzrost zawartości dwutlenku węgla i spadek ilości tlenu w krwi zarodków. Również Girard [1973] podaje, że krótkotrwałe zmniejszenie zawartości tlenu i zwiększenie poziomu dwutlenku węgla w krwi powoduje obniżenie tempa pracy serca.

W trakcie badań dokonano szczegółowej analizy balistokardiogramów zarodków, które zamarły w późniejszym etapie inkubacji. Badania te wykazały, że w dniach poprzedzających śmierć zarodka występowały duże zakłócenia w zapisach, będące najprawdopodobniej efektem gwałtownych ruchów zarodka (rys. 4). Obserwacja powyższa może mieć znaczenie aplikacyjne w badaniach z użyciem zarodków ptasich, jako modelu w badaniach biologicznych.



Rys. 4. Balistokardiogram zarodka kaczki dzień przed zamarciem
Fig. 4. Ducks embryo ballistocardiogram one day before death

Przeprowadzone pomiary wykazały, że sygnał pochodzący z jaj niezapłodnionych różnił się istotnie od sygnału pochodzącego od żywych zarodków (rys. 5). W zarejestrowanym zapisie brak było powtarzalnych, regularnych sygnałów obserwowanych w trakcie rejestracji pracy serca zarodków ptasich.



Rys. 5. Sygnał pochodzący z jaja niezapłodnionego
 Fig. 5. Signal obtained from unfertilized chicken eggs

Wykonana analiza odpadu powylęgowego wykazała brak zaburzeń w inkubacji wszystkich badanych gatunków ptaków domowych. Uzyskane wyniki nie wykazały wzrostu anomalii rozwojowych zarodków oraz wystąpienia innych zaburzeń w procesie embriogenezy. Również wylęgowość u wszystkich badanych gatunków kształtowała się na prawidłowym poziomie. U kur typu mięsnego (Ross 308) wynosiła ona 84,5%, kur typu nieśnego (Hy-Line) – 91,3%, przepiórki japońskiej – 84,3%, perlicy – 76,7%, gęsi białej włoskiej – 64,3%, kaczki piżmowej – 79,7%.

PODSUMOWANIE

Pierwsze powtarzalne sygnały świadczące o pracy serca badanych zarodków udało się zarejestrować w 9. dobie inkubacji (u przepiórki w 10 dobie). Między 9. a 11. dobą inkubacji u wszystkich badanych zarodków stwierdzono spadek tempa pracy serca. Wyjątek stanowiły zarodki przepiórki, gdzie między 10. a 15. dniem inkubacji obserwowano wzrost liczby skurczów przypadających na jednostkę czasu. Spadkowe tendencje w tempie pracy serca u wszystkich badanych zarodków stwierdzono również w końcowym okresie inkubacji. Wśród badanych gatunków ptaków domowych zdecydowanie najwyższe tempo pracy serca stwierdzono u zarodków przepiórki, co prawdopodobnie ma związek z bardzo małą masą embrionu tego ptaka. Uzyskane wyniki potwierdzają tezę, że balistokardiografia bezkontaktowa jest bardzo dobrą metodą pozwalającą bezinwazyjnie śledzić rozwój zarodków ptasich.

Pracę wykonano w ramach Grantu N 311 024 32/2072.

PIŚMIENNICTWO

Antoni H., Diliger W., 1981. Methodische Möglichkeiten zur Registrierung der Herzaktion am takten bebrüteten Hühnerei. *Arzneim. Forsch.* 31 (II) 9, 1436–1445.

- Aubert A.E., Beckers F., Ramaekers D., Verheyden B., Leribaux C., Aerts J.M., Berckmans D., 2004. Heart rate and heart rate variability in chicken embryos at the end of incubation. *Exp. Physiol.* 89 (2), 199–208.
- Borzemska W.B., Niedziółka J., 1984. Zoohigieniczne problemy w patologii łęgów. *Życie Weter.* 59, 6–10.
- Borzemska W.B., Malec H., 1986. Biologiczna i patomorfologiczna ocena łęgu kur przy zaburzeniach synchronizacji klucia. *Med. Weter.* 43, 409–412.
- Freeman B.M., Misson B.H., 1970. Ph, pO₂ and p CO₂ of blood from the foetus and neonate of *Galus domesticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 33, 763–772.
- Girard H., 1973. Arterial pressure in the chick embryo. *Am. J. Physiol.* 224, 454–460.
- Han B.K., Kim J.N., Shin J.H., Kim J.K., Jo D.H., Kim H., Han J.Y. 2005. Proteome analysis of chicken embryonic gonads: identification of major proteins from cultured gonadal primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 72 (4), 521–9.
- Haque M.A., Watanabe W., Ono H., Sakamoto Y., Tazawa H., 1994. Comparisons between invasive and noninvasive determinations of embryonic heart rate in chickens. *Comp. Biochem. Physiol.* 108 A, 221–227.
- Janowski T.M., Szymański A.J., 2000. Non-invasive testing of chicken embryo for electric field. *Acta Agric. Silv. Ser. Zootechnica* 338, 109–115.
- Keef J.F., Rauterkus L.T., Wolk M.J., Brand D.H., Levine H.J., 1970. Electrostatic ballistogram: Analysis of electrical fields about the human body. *J. Appl. Physiol.* 28 (1), 89–91.
- Khandoker A.H., Działowski E.M., Burggren W.W., Tazawa H., 2003. Cardiac rhythms of late pre-pipped and pipped chick embryos exposed to altered oxygen environments. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 136 (2), 289–99.
- Krull C.E., 2004. A primer on using in ovo electroporation to analyze gene function. *Dev. Dyn.* 229 (3), 433–439.
- Nichelmann M., Höchel J., Tzschentke B., 1999. Biological rhythms in birds-development, insights and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 124 (4), 429–437.
- Pawlak K., Niedziółka J., Tombarkiewicz B., 2001. Urządzenie do pomiaru balistokardiogramu zarodków kurzych. *Proceedings of 9th International Symposium. „Current Problems of Breeding, Health and Production of Poultry”.* 6–7th February 2001, Czeskie Bubejovice, 128.
- Pawlak K., Niedziółka J., Szymański J., 2002. An attempt to use ballistocardiography to depict the cardiac work of developing chick embryos. *Ann. Anim. Sci.* 2, 59–65.
- Pawlak K., Niedziółka J., 2004. Non-invasive measurement of chick embryo cardiac work. *Cz. J. Anim. Sci.* 49 (1), 8–15.
- Pawlak K., Wojtysiak D., 2004. Effects of temperature of incubation on chick embryo heart. *Ann. Anim. Sci.* 1 (suppl), 235–238.
- Suzuki Y., Musashi H., Tazawa H., 1989. Noninvasive heart rate monitoring system for avian embryos based on the balistocardiogram. *Med. Biol. Eng. Comput.* 27, 399–404.
- Szymański J., Pawlak K., Wasowicz P., Mościcki J., 2002. Capacitive detection of micromotions: Monitoring ballistics of a developing avian embryo. *Rev. Sci. Instrum.* 73 (9), 3313–3317.
- Tazawa H., Hashimoto Y., Takami M., Yufu Y., Whittow G.C., 1993. Simple, noninvasive system for measuring the heart rate of avian embryos and hatchlings by means of a piezoelectric film. *Med. Biol. Eng. Comput.* 31, 129–134.

Tazawa H., Hiraguchi Y., Kuroda O., Tullett S.D., Deeming D.C., 1991. Embryonic heart rate during development of domesticated birds. *Physiol. Zool.* 64, 1002–1022.

Williams T.D., Monaghan P., Mitchell P.I., Scott I., Houston D.G., Ramsey S., Ensor K., 1997. Evaluation of non-destructive method for determining egg composition using total body electrical conductivity (TOBEC) measurements. *J. Zool. Lond.* 243, 611–622.

HEART RATE OF CHOSEN SPECIES OF DOMESTIC BIRDS

Abstract. The aim of this study was analysis of embryos heart rate of some species of domestic birds: chicken, japanese quail, guinea fowl, duck and goose throughout embryonic development. The study was conducted with the use non-contact method of ballistocardiography. In the beginning of incubation (9th–10th days) decrease in heart rate of embryos were observed except quail. Also in the final period of development in all embryos decrease of heart rate was found out. Great disturbances in ballistocardiograms were observed on days preceding embryonic deaths.

Key words: ballistocardiography, chicken embryo, embryogenesis, heart

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 26.10.2010

