

## Metody oceny metabolizmu tkanki kostnej u drobiu\*

Joanna Wojciechowska-Puchalka, Dorota Wojtysiak

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Anatomii Zwierząt, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków;  
j.wojciechowska@ur.krakow.pl

Schorzenia<sup>1</sup> układu kostnego drobiu są poważnym problemem dla produkcji drobiarskiej, w szczególności u ptaków wysokoprodukcyjnych. Właściwa kondycja układu kostnego ma bezpośredni wpływ na metabolizm i rozwój całego organizmu oraz oddziałuje na efektywność chowu i hodowli, determinując dobrostan ptaków. Selekcja genetyczna, żywienie, gospodarka hormonalna, a także wiek i płeć bezpośrednio lub pośrednio wpływają na dynamikę przebiegu procesów kostnienia (Tykałowski i in., 2010). Metody użytkowania drobiu stworzyły wyższe wymagania co do wytrzymałości mechanicznej układu kostnego u tych zwierząt. Intensywne tempo wzrostu i rozwoju, a także wyższy stosunek masy mięśniowej do masy kostnej prowadzi u brojlerów do licznych przeciążeń oraz schorzeń kości. W ciągu ostatnich dwudziestu lat znacznie wzrosła częstotliwość złamań kości u drobiu (Cook, 2000; Knowles i in., 2008). Według Tataru i in. (2014), schorzenia układu kostnego mogą dotyczyć nawet 30% brojlerów w stadzie. Choroby metaboliczne kości prowadzą do zmniejszenia dziennych przyrostów masy ciała oraz masy ubojowej, deformacji mięśni piersiowych, infekcji bakteryjnych, gorszego wykorzystania paszy, kulawizn, krzywicy, a w konsekwencji – zwiększonej śmiertelności w stadzie (Crespo i in., 2000; Lynch i in., 1992; Richards, 2010; Tatar, 2014). Z uwagi na skalę występowania patologii w obrębie układu szkieletowego u drobiu istnieje potrzeba poznania metod oceny metabolizmu tkanki kostnej, tj. absorpcjometrii promieniowania X o podwójnej energii, tomografii komputerowej, badań mechanicznych kości, biochemicznych

wskaźników przebudowy kości czy histomorfometrii.

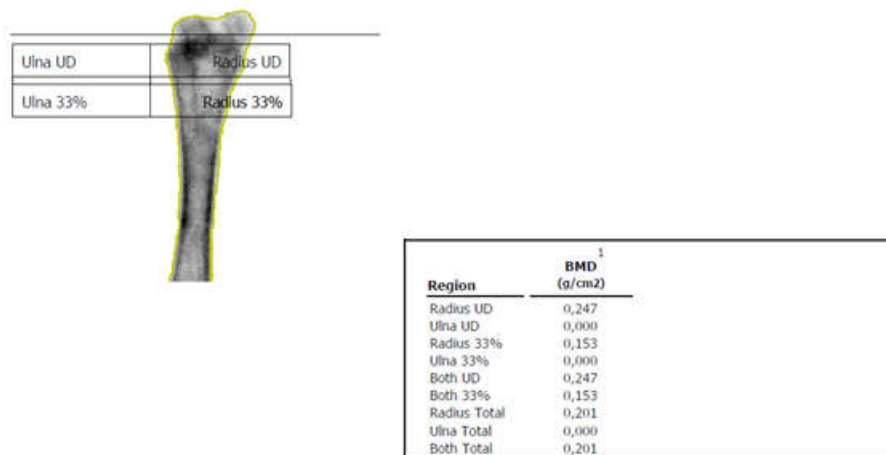
### Absorpcjometria promieniowania X o podwójnej energii

Absorpcjometria promieniowania X o podwójnej energii, zwana częściej DEXA (z ang. Dual-energy x-ray absorptiometry) jest znaną techniką umożliwiającą wczesne wykrywanie zmian zachodzących w tkance kostnej. W aparatach densytometrycznych źródło promieniowania stanowi lampa rentgenowska emitująca wiązkę o dwóch energiach. Porównanie poziomu pochłaniania wiązki o niższej energii i wiązki o wyższej energii pozwala określić masę oraz skład tkanki, przez którą przechodzi promieniowanie. Technika ta pozwala na pomiar gęstości mineralnej kości – BMD (z ang. Bone Mineral Density) dla pewnego obszaru zainteresowania – ROI (z ang. Region of Interest) bądź dla całej kości. Wartość BMD przeliczana jest na jednostkę powierzchni i wyrażana w g/cm<sup>2</sup>. DEXA pozwala także określić masę zmineralizowanej tkanki kostnej w określonej okolicy ciała – BMC (z ang. Bone Mineral Content). Wartość ta jest wyrażana w gramach. Przykładowy wynik badania densytometrycznego kości piszczelowej kurcząt brojlerów został przedstawiony na fot. 1 i 2. Zaletami tej techniki jest duża dokładność, szybki czas i prostota wykonania badania, a także niewielka dawka promieniowania rentgenowskiego. Wadą natomiast jest niemożność wyeliminowania błędów pomiarów gęstości kości, spowodowanych obecnością innych tkanek (tj. skóra, pióra, mięśnie) ochraniających badane kości. Dodatkowo cechują ją wysokie koszty oraz brak mobilności aparatury, co ogranicza wykonanie badań środowiskowych. Jednakże, wielu autorów potwierdziło w swoich pracach przydatność tej techniki w ocenie

\*Badania zostały sfinansowane z dotacji celowej na naukę przyznanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego; BM-4276 i DS-3253/ZA.

metabolizmu tkanki kostnej u drobiu (Fettereri in., 2013; Mitchell i in., 1997; Salas i in., 2012;

Schreiweis i in., 2003; Shahnazari i in., 2006; Talaty i in., 2009).



Fot. 1. Przykładowy wynik badania densytometrycznego kości piszczelowej kurcząt brojlerów

*Fig. 1. Exemplary result of tibia densitometry in broiler chickens*

(J. Wojciechowska-Puchałka)

Region	BMD <sup>1</sup> (g/cm <sup>2</sup> )	Young-Adult <sup>2</sup> (%)	T-score	Age-Matched <sup>2</sup> (%)	Z-score	BMC (g)	Area (cm <sup>2</sup> )
Radius UD	0,247	-	-	-	-	0,38	1,55
Ulna UD	0,000	-	-	-	-	0,00	0,00
Radius 33%	0,153	-	-	-	-	0,17	1,11
Ulna 33%	0,000	-	-	-	-	0,00	0,00
Both UD	0,247	-	-	-	-	0,38	1,55
Both 33%	0,153	-	-	-	-	0,17	1,11
Radius Total	0,201	-	-	-	-	0,60	2,98
Ulna Total	0,000	-	-	-	-	0,00	0,00
Both Total	0,201	-	-	-	-	0,60	2,98

Fot. 2. Przykładowy wynik badania densytometrycznego kości piszczelowej kurcząt brojlerów

*Fig. 2. Exemplary result of tibia densitometry in broiler chickens*

(J. Wojciechowska-Puchałka)

### Ilościowa tomografia komputerowa

Tomografia komputerowa – CT (z ang. Computed Tomography) jest techniką służącą do obrazowania przekrojów poprzecznych ciała przy użyciu promieniowania rentgenowskiego (promienie X, RTG). Metoda ta pozwala na uzyskanie warstwowych przekrojów ukazujących zarys, a także strukturę wewnętrzną narządów, tj. ich wielkość czy kształt. Dzięki wysokiej precyzji znalazła ona zastosowanie w badaniach układu kostnego jako ilościowa tomografia komputerowa – QCT (z ang. Quantitative Computed Tomography). Technika ta wykorzystuje zjawie-

sko osłabienia wiązki promieniowania podczas przechodzenia przez określony obiekt (prawo Lamberta-Berra). W trakcie badania część promieniowa zostaje pochłonięta bądź rozproszona. Na pochłanianie promieniowania w znacznym stopniu wpływa zawartość minerałów oraz grubość kości. Pomiar natężenia promieniowania wyjściowego oraz pomiar natężenia promieniowania po przejściu przez kość pozwalają na wyznaczenie jej masy. Przez porównanie uzyskanej wartości do objętości otrzymujemy objętościową gęstość mineralną kości – VBMD (z ang. Volumetric Bone Mineral Density) wyrażaną w g/

cm<sup>3</sup>. Zaletą tej techniki jest możliwość pomiaru VBMD w każdej kości szkieletu bez względu na jej strukturę. Dodatkowo, pozwala ona na niezależny pomiar VBMD dla istoty gąbczastej i istoty zbitnej kości. Dodatkłą cechą QCT jest również możliwość wykonania pomiarów geometrycznych kości, a także pola powierzchni istoty zbitnej i gąbczastej. Tomografia komputerowa służy nie tylko do diagnostyki, ale także do monitorowania zmian patologicznych w tkance kostnej. W przeciwieństwie do absorpcjometrii promieniowania X o podwójnej energii technika ta należy do metod powtarzalnych i obiektywnych. Całkowicie eliminuje ona błędy pomiaru gęstości mineralnej spowodowane obecnością tkanek miękkich czy piór. Dzięki temu właśnie znalazła także zastosowanie w badaniach układu kostnego drobiu (Charuta i in., 2012, 2013; Leslie i in., 2006; Tataru i in., 2005).

#### **Badania mechaniczne kości**

Wiedza na temat parametrów mechanicznych tkanki kostnej ułatwia ocenę rozkładów naprężeń i odkształceń występujących w kości na skutek obciążeń zewnętrznych. Ważna jest zatem prawidłowa ocena korelacji pomiędzy właściwościami mechanicznymi a strukturą tkanki kostnej. Na właściwości tkanki kostnej wpływają: wiek zwierzęcia, płeć, stan zdrowia, gatunek, a także budowa, skład chemiczny (pierwiastkowy) i geometria kości. Wraz z wiekiem obniża się wytrzymałość istoty zbitnej, a co za tym idzie zwiększa się jej podatność na złamania. Budowa wewnętrzna i własności mechaniczne tkanki kostnej adaptują się do zmieniających się warunków obciążenia. Do własności mechanicznych należą: wytrzymałość (zdolność kości do przenoszenia obciążeń bez jej zniszczenia), sprężystość (zdolność kości do odzyskania pierwotnego kształtu i rozmiaru po usunięciu obciążeń), plastyczność (zdolność kości do zmiany kształtu po zdjęciu obciążeń) i twardość (odporność kości na odkształcenia trwałe pod wpływem sił działających na niewielką powierzchnię kości). Przeprowadzenie badań wytrzymałościowych kości wymaga użycia specjalistycznego sprzętu, np. aparatu Instron czy MTS Criterion wraz z komputerem rejestrującym dane. Kości długie są najczęściej poddawane trzypunktowym bądź czteropunktowym próbom na złamanie, zginanie lub skręcanie. Do najczęściej analizowanych parametrów mechanicznych

można zaliczyć moduł Younga, określający sprężystość kości, granicę sprężystości, wytrzymałość na ściskanie, ciągliwość czy energię odkształcenia. Wirtz i in. (2000) potwierdzili korelację wytrzymałości na ściskanie i modułu Younga z gęstością kości. Stąd też, badania wytrzymałościowe kości drobiu stały się obiektem zainteresowań naukowców (Burs i in., 2008; Kwiatkowska i in., 2016; Kwiecień, 2006).

#### **Biochemiczne wskaźniki przebudowy kości**

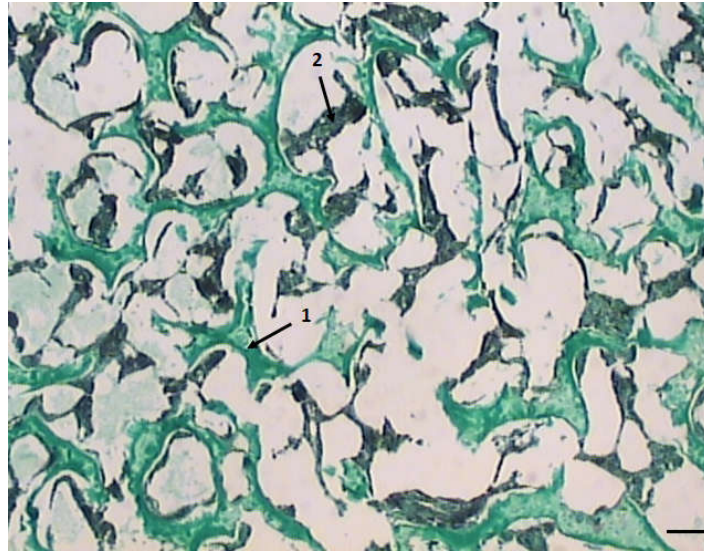
Oznaczenie biochemicznych markerów obrotu kostnego pozwala na ocenę szybkości procesów kościotworzenia i resorpcji. U drobiu są one oznaczane z surowicy krwi. Do markerów syntezy kości zaliczamy m.in.: frakcję alkalicznej fosfatazy (BAP, z ang. bone-specific alkaline phosphatase), osteokalcynę (OC, z ang. osteocalcin), markery osteoklastogenezy (RANK/RANKL, z ang. receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B/ligand) oraz osteoprotegerynę (OPG, z ang. osteoprotegerin), C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (PICP, z ang. procollagen type I carboxy-terminal propeptide) i N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (PINP, z ang. procollagen type I amino-terminal propeptide). Z kolei, do markerów resorpcji należą m.in.: hydroksyprolina (HYP, z ang. hydroxyproline), pirydynolina (PYD, z ang. pyridinoline), deoksypirydynolina (DPD, z ang. deoxypyridinoline), N-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha alfa kolagenu typu I (NTX, z ang. N-terminal telopeptide of type I collagen), C-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha alfa kolagenu typu I (CTX, z ang. C-telopeptide of type I collagen). W badaniach na drobiu najczęściej mierzonymi parametrami we krwi są: alkaliczna fosfataza, wapń, fosfor oraz albuminy. Na wynik pomiaru ma wpływ wiele czynników, w tym sposób pobrania próbek, ich zabezpieczenie, transport, sposób przechowywania, a przede wszystkim wykorzystane techniki analityczne. Markery obrotu kostnego umożliwiają ocenę przemian metabolicznych kości i stanowią miarę tempa obrotu kostnego, dzięki czemu zasłużyły na uwagę w pracach wielu autorów (Chen i in., 2006; Guo i in., 2011).

#### **Badania histomorfometryczne**

Histomorfometria jest metodą badawczą opierającą się na wykonaniu pomiarów oraz

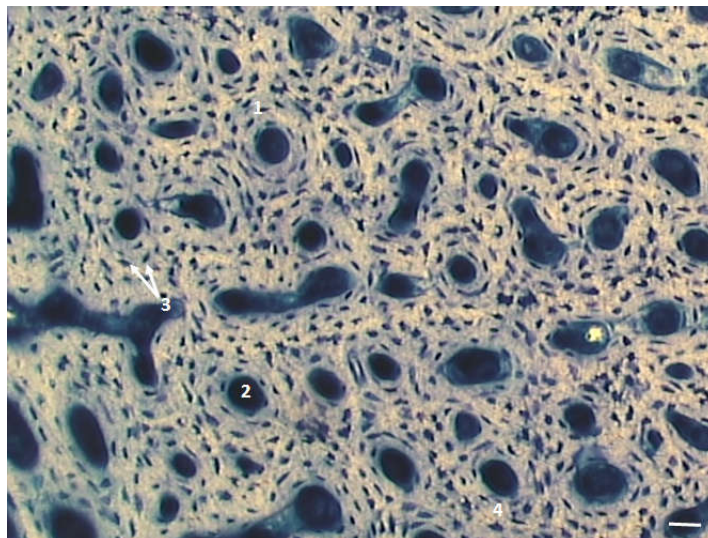
określeniu liczby struktur tworzących tkanki. Ocena preparatów histologicznych kości służy do ilościowego opisu jakości tkanki kostnej, a także charakterystyki dynamiki procesów metabolicznych. Dla właściwej oceny histomorfometrycznej należy zrozumieć anatomię tkanki kostnej

oraz procesy związane z jej przebudową. Istotę gąbczastą (fot. 3) tworzy sieć rozgałęzionych beleczek. Układ beleczek kostnych zapewnia wytrzymałość mechaniczną nasad kości długich. Istota zbita (fot. 4) tworzy natomiast trzony kości długich.



Fot. 3. Tkanka kostna gąbczasta kości piszczelowej kurcząt brojlerów: 1 – beleczki kostne, 2 – szpik kostny (Masson Trichome; skala = 100  $\mu$ m)

*Fig. 3. Spongy bone tissue of tibia in broiler chickens: 1 – bone trabeculae, 2 – bone marrow (Masson Trichome; scale = 100  $\mu$ m)*



Fot. 4. Tkanka kostna zbita kości udowej kurcząt brojlerów: 1 – osteon, 2 – kanał Haversa, 3 – jamki kostne, 4 – blaszki systemowe (Toluidine blue; skala = 30  $\mu$ m)

*Fig. 4. Compact bone tissue of femoral bone in broiler chickens: 1 – osteon, 2 – Haversian canal, 3 – osteocytic lacunae, 4 – lamella ossea (Toluidine blue; scale = 30  $\mu$ m)*

Do klasycznych wskaźników oceny struktury istoty gąbczastej należą m.in.: BS (z ang. Bone Surface), czyli pole powierzchni tkanki wypełniającej próbkę, BV (z ang. Bone Volume) – objętość tkanki kostnej zawartej w próbce, Conn.D (z ang. Connective Degree) – ilość połączeń beleczek przypadających na jednostkę objętości próbki, DA (z ang. Degree of Anisotropy) – stopień anizotropii budowy poszczególnymi osiami w próbce, Tb.N (z ang. Trabecular Number) – średnia liczba beleczek na jednostkę pola powierzchni lub objętości, Tb.Sp (z ang. Trabecular Separation) – średnia odległość pomiędzy beleczkami w próbce, Tb.Th (z ang. Trabecular Thickness) – średnia grubość beleczki w próbce oraz TV (z ang. Trabecular Volume), czyli objętość próbki istoty gąbczastej. Do klasycznych pomiarów struktury istoty zbitanej można natomiast zaliczyć między innymi: liczbę osteonów pierwotnych, liczbę osteonów wtórnych, grubość blaszek systemowych, grubość blaszek międzysystemowych.

Istnieje kilka procedur związanych z wykonaniem preparatów mikroskopowych z tkanki kostnej. Jedną z nich jest sporządzenie preparatów nieodwapnionych, np. skrawków kriostatowych, dzięki którym istnieje możliwość oceny ilościowej wszystkich składowych tkanki. Wówczas tuż po pobraniu materiału należy go zamrozić w ciekłym azocie bądź na suchym lodzie, a następnie przechowywać w temp.  $-80^{\circ}$  aż do momentu analizy. Można także wykonywać preparaty odwapnione. Do odwapnienia kości stosuje się szereg roztworów, m. in. kwas solny, EDTA, czy mieszaniny EDTA i utrwalacza, np. formaliny. Jest to jednak proces długotrwały, trwający nawet do

6 tygodni. Odwapnione i utrwalone tkanki można wówczas zatopić w odpowiednim do krojenia medium, np. celoidynie, parafinie czy żywicach. Proces ten pozwala na pokrojenie tkanki na odpowiednio cienkie skrawki (około 5–6  $\mu\text{m}$ ). Przygotowane w ten sposób preparaty są gotowe do barwienia. Do klasycznych barwień histologicznych tkanki kostnej należą m. in. barwienie hematoksyliną i eozyną, barwienie trójbarwne Massona Trichome, Von Kossa, Van Giesona i in. Metody histomorfometryczne stosowane do analizy tkanki kostnej pozwalają przede wszystkim na ilościową, a także jakościową analizę badanych cech. Stanowią także najdokładniejsze źródło informacji na temat struktury i metabolizmu tkanki kostnej.

### **Podsumowanie**

Analiza piśmiennictwa poświęconego temu zagadnieniu wykazała, że istnieje szereg metod umożliwiających ocenę tkanki kostnej drobiu. W trakcie wzrostu i rozwoju zwierząt dochodzi do remodelingu kości, a także zmian patologicznych. Możliwość oceny wytrzymałości mechanicznej kości, absorpcjometria promieniowania X o podwójnej energii, ilościowa tomografia komputerowa, histomorfometria stanowią najbardziej wiarygodne metody oceny jakości układu kostnego. Dlatego też, rozwój technik oraz metod pozwalających na ocenę stanu struktury kości mogą przyczynić się do obniżenia strat ekonomicznych w produkcji drobiarskiej, a także poprawy zdrowotności tych zwierząt. Prawidłowo zbilansowana dieta, a także zapewnienie odpowiednich warunków zoohigienicznych wydają się być kluczowym zagadnieniem podczas odchowu ptaków.

### **Literatura**

- Burs M., Zdybel A., Faruga A., Laskowski J. (2008). Wpływ sposobu utrzymania indorów na wytrzymałość kości udowej i piszczelowej. *Med. Weter.*, 64, 2: 202–206.
- Charuta A., Dzierżęcka M., Biesiada-Drzazga B. (2012). Evaluation of densitometric and geometric parameters of tibiotarsal bones in turkeys. *Bull Vet. Inst. Pulawy*, 56: 379–384.
- Charuta A., Dzierżęcka M., Komosa M., Kalinowski Ł., Pierzchała M. (2013). Age- and sex-related differences of morphometric, densitometric and geometric parameters of tibiotarsal bone in Ross broiler chickens. *Folia Biol. (Krakow)*, 61, 3–4: 211–220.
- Chen K.L., Tsay S.M., Lee T.Y., Chiou P.W.S. (2006). Effects of caponization and different exogenous androgen on the bone characteristics of male chickens. *Poultry Sci.*, 85, 11: 1975–1979.
- Cook M.E. (2000). Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poultry Sci.*, 79, 7: 982–984.
- Crespo R., Stover S.M., Taylor K.T., Chin R.P., Shivaprasad H.L. (2000). Morphometric and mechanical proper-

- ties of femora in young adult male turkeys with and without femoral fractures. *Poultry Sci.*, 79: 602–608.
- Fetterer R.H., Miska K.B., Mitchell A.D., Jenkins M.C. (2013). The use of dual-energy X-ray absorptiometry to assess the impact of *Eimeria* infections in broiler chicks. *Avian Dis.*, 57, 2: 199–204.
- Guo X., Yan S., Shi B., Feng Y. (2011). Effects of excessive vitamin A on alkaline phosphatase activity and concentrations of calcium-binding protein and bone gla-protein in culture medium and CaBP mRNA expression in osteoblasts of broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24: 239–245.
- Knowles T.G., Kestin S.C., Haslam S.M., Brown S.N., Green L.E., Butterworth A., Pope S.J., Pfeiffer D., Nicol C.J. (2008). Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. *PLoS One*, 3, 2, e1545.
- Kwiatkowska K., Kwiecień M., Winiarska-Mieczan A., Bąkowski M. (2016). Wpływ chelatu glicynowego miedzi na parametry fizykochemiczne, morfometryczne i wytrzymałościowe kości piszczelowych kurcząt. *Ann. UMCS, sec. EE, Zootechnica*, 34, 1: 1–14.
- Kwiecień M. (2006). Wpływ jęczmienia nagoziarnistego na skład mineralny i wytrzymałość kości piszczelowych kurcząt brojlerów. *Acta Agrophys.*, 8, 3: 681–687.
- Leslie M.A., Coleman R.A., Moehn S., Ball R.O., Korver D.R. (2006). Relationship between bicarbonate retention and bone characteristics in broiler chickens. *Poultry Sci.*, 85, 11: 1917–1922.
- Lynch M., Thorp B., Whitehead C. (1992). Avian tibia dyschondroplasia as a cause of bone deformity. *Avian Pathol.*, 21: 275–285.
- Mitchell A.D., Rosebrough R.W., Conway J.M. (1997). Body composition analysis of chickens by dual energy X-ray absorptiometry. *Poultry Sci.*, 76, 12: 1746–1752.
- Richards J.D., Zhao J., Harrell R.J., Atwell C.A., Dibner J.J. (2010). Trace mineral nutrition in poultry and swine. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23: 1527–1534.
- Salas C., Ekmay R.D., England J., Cerrate S., Coon C.N. (2012). Determination of chicken body composition measured by dual energy X-ray absorptiometry. *Int. J. Poultry Sci.*, 11, 7: 462–468.
- Schreiweis M.A., Orban J.I., Ledur M.C., Hester P.Y. (2003). The use of densitometry to detect differences in bone mineral density and content of live White Leghorns fed varying levels of dietary calcium. *Physiol. Reprod.*, 82, 8: 1292–1301.
- Shahnazari M., Sharkey N.A., Fosmire G.J., Leach R.M. (2006). Effects of strontium on bone strength, density, volume, and microarchitecture in laying hens. *J. Bone Miner. Res.*, 21, 11: 1696–1703.
- Talaty P.N., Katanbaf M.N., Hester P.Y. (2009). Life cycle changes in bone mineralization and bone size trait of commercial broilers. *Poultry Sci.*, 88, 5: 1070–1077.
- Tatara M.R., Sierant-Roźmiej N., Krupski W., Majcher P., Śliwa E., Kowalik S., Studziński T. (2005). Zastosowanie ilościowej tomografii komputerowej w ocenie mineralizacji kości udowej i piszczelowej indyka. *Med. Weter.*, 61, 2: 225–228.
- Tatara M.R., Rosenbeiger P., Chmielowiec K., Charuta A., Krupski W. (2014). Schorzenia układu kostnego u drobiu. *Mag. Wet.*, 23: 378–384.
- Tykałowski B., Stenzel T., Koncicki A. (2010). Selected problems to ossification processes and their disorders in birds. *Med. Weter.*, 66: 464–469.
- Wirtz D.C., Schiffers N., Pandorf T., Radermacher K., Weichert D., Forst R. (2000). Critical evaluation of known bone material properties to realize anisotropic FE-simulation of the proximal femur. *J. Biomech.*, 33, 10: 1325–1330.



## METHODS FOR EVALUATION OF BONE TISSUE METABOLISM IN POULTRY

### Summary

Proper functioning of the poultry skeletal system is essential for the normal development and metabolism of the whole body. The rapid rate of growth and development, as well as the higher ratio of muscle mass to bone mass in broiler leads to bone overloading and abnormalities. Bone metabolic diseases result in reduced daily weight gains and slaughter weight, pectoral muscle deformities, bacterial infections, higher feed conversion, lameness and rickets, thus increasing flock mortality. Therefore, the aim of this study was to analyse different methods of evaluating bone tissue metabolism in poultry, namely dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA), quantitative computed tomography (QCT), bone mechanical tests, biochemical markers of bone metabolism, as well as histomorphometric tests. A better understanding of the skeletal system function in poultry is important to poultry breeding. Numerous bone tissue pathologies are the main factor limiting the profitability of poultry production. It is therefore necessary to perform an optimal evaluation of the skeletal system quality in these birds.

**Key words:** poultry, bone tissue metabolism, bone metabolic diseases



Drób w gospodarstwie agroturystycznym – A. J. Zaborowskich w Kotowinie  
*Poultry in agritourism farm – A. & J. Zaborowscy in Kotowina*

Fot. D. Dobrowolska (s. 117 i 118).