

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ
МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ - МВА имени К.И. СКРЯБИНА»

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по применению кормовых добавок для улучшения
продуктивности и стрессоустойчивости яичной
ПТИЦЫ

Москва 2019

УДК 636.5.084.522.

Практические рекомендации по применению кормовых добавок для улучшения продуктивности и стрессоустойчивости яичной птицы. – М.: Издательство Сельскохозяйственные технологии, 2019.- 48с.

Рекомендации подготовили: Кочиш И.И., акад. РАН, д. с.-х. н., профессор ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Романов М.Н., к. б. н., ведущий ученый мегагранта ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, исследователь Университета Кента (Великобритания); Мясникова О.В., к.с.-х.н., доцент ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Смоленский В.И., д. б. н. профессор ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Мартынов В.В., к. б. н. заведующий лабораторией Экологической биохимии МГОУ; Никонов И.Н., к. б. н., доцент ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Селина М.В., к. п. н., доцент ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Колесникова Р.Р., аспирант ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Берникова К.Е., студент магистратуры ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Мотин М.А., студент ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Рецензент: Коломиец С.Н., д.б.н. профессор, зав. кафедрой кормления и кормопроизводства ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Практические рекомендации разработаны в рамках Договора о выделении гранта № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г. в рамках реализации постановления Правительства Российской Федерации от 9 апреля 2010 г. № 220 по теме «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве».

Рекомендации предназначены для специалистов и руководителей птицеводческих хозяйств, фермеров, научных работников, преподавателей и студентов сельскохозяйственных вузов, слушателей системы повышения квалификации.

Практические рекомендации одобрены УМК ФЗТА, Протокол № 13 от «03» ноября 2019 г.

ISBN 978-5-6043642-9-1

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Обзор биологически активных добавок	5
Глава 2. Методы отбора образцов для исследований и оценки экспрессии генов	12
Глава 3. Экспрессия генов продуктивности и устойчивости яичной птицы	17
Глава 4. Влияние фитобиотиков на экспрессию генов	25
Глава 5. Влияние пребиотиков на микрофлору и экспрессию генов	27
Глава 6. Влияние пробиотиков на экспрессию генов	33
Глава 7. Влияние адсорбентов на экспрессию генов	36
Заключение	39
Список литературы	40

Введение

Повышение продуктивности птицы является приоритетной задачей в современном высокоинтенсивном промышленном птицеводстве. При этом инфекционные заболевания бактериальной этиологии являются основной причиной снижения продуктивности у кур-несушек, наряду с неправильным кормлением и содержанием. Традиционно для борьбы с бактериальными инфекциями в ветеринарной практике используют антибиотики. Современные антибиотики обладают бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, хламидий (*Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*) и микоплазм (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*). В то же время антибиотики обладают рядом нежелательных побочных действий. В результате их применения угнетается микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), ослабляется иммунитет, у патогенных микроорганизмов развиваются антибиотикоустойчивость или даже антибиотикозависимость [17, 18]. Это делает дальнейшее использование антибиотиков неэффективным. Многие из них накапливаются в продуктах птицеводства, представляя опасность для человека [20]. Подобные отрицательные последствия использования антибиотиков уже послужили причиной их запрета в США и странах Западной Европы [1].

В мире постоянно растет спрос на органическую продукцию птицеводства. Поэтому применение альтернативных антибиотикам препаратов, улучшающих здоровье птицы, качество получаемых продуктов и не представляющих опасности для человека, имеет большой практический интерес как для самих производителей, так и для потребителей [7]. К числу таких препаратов относят фитобиотики, пробиотики, пребиотики, симбиотики, адсорбенты и иммуномодуляторы.

Яичная продуктивность – это полигенный признак, определяемый взаимодействием большого количества факторов, таких как формирование фолликулов, частота овуляции, скорость образования белка яйца, подскорлупных оболочек, скорлупы и т. д. [2]. От того, какие гены сильнее экспрессируют, зависит характер продуктивных показателей птицы. В данных практических рекомендациях рассматриваются вопросы молекулярно-генетической оценки различных коммерческих препаратов, предлагаемых для увеличения продуктивности, приобретенной и врожденной резистентности, а также стрессоустойчивости яичной птицы.

Глава 1. Обзор биологически активных добавок

Фитобиотики представляют собой натуральные кормовые добавки растительного происхождения. В отличие от антибиотиков, фитобиотики не угнетают микрофлору кишечника и могут применяться на постоянной основе [19]. Они стимулируют выработку эндогенных ферментов, улучшая таким образом

переваримость питательных веществ кормов. Кроме того, содержащиеся в них эфирные масла и фенольные соединения оказывают положительное влияние на пищеварение и здоровье в целом. Воздействие фитобиотиков на пищеварение и общее состояние здоровья животных проявляется благодаря ряду биологически активных веществ растительного происхождения, таких как каротиноиды, полипептиды, фитоэстрогены, сапонины и др. Фитобиотики также обладают противовирусным, противомикробным и иммуномодулирующим действием. Фитобиотики могут оказывать противовоспалительное действие и быть антагонистами ряда болезнетворных бактерий, обитающих в кишечнике животных (за счет влияния карвакрола, борнеола, эвгенола, коричневого альдегида, тимола и других веществ). Кроме того, они стимулируют выработку пищеварительных ферментов и улучшают усвояемость кормов [5, 6]. В состав фитобиотиков чаще всего входят отдельные экстракты или смеси трав, цветов, ягод, специй, древесных растений, хвои, смолы и т. п. Фитобиотики производятся в виде экстрактов, порошков и эфирных масел. На животноводческих предприятиях фитобиотики применяются для профилактики заболеваний, а также улучшения роста скота и птицы [4, 8, 12].

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые обитают в организме животных и человека и положительно влияют на его жизнедеятельность. Большинство пробиотиков являются бактериями или кокками, продуцирующими молочную кислоту и относящимися к типичным представителям нормальной

микробиоты животного организма. К основным пробиотическим микроорганизмам относятся лактобациллы (*Lactobacillus spp.*), бифидобактерии (*Bifidobacterium spp.*), пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium spp.*), стрептококки вида *Streptococcus thermophilus* и бактерии рода *Lactococcus*. При отборе пробиотических штаммов используют четкие критерии, в соответствии с которыми штаммы не могут обладать патогенными свойствами (должны быть безопасными), должны быть кислотоустойчивыми (сохраняться под воздействием желудочного сока или быть заключены в кислотоустойчивую капсулу) и обладать способностью выживать в просвете кишечника.

Пробиотики действуют на экосистему ЖКТ путем влияния на иммунокомпетентные структуры слизистой оболочки, взаимодействия с симбиотическими или условно-патогенными микробами, синтеза продуктов метаболического обмена и коммуникации с клетками организма-хозяина посредством химических сигналов [9]. Пробиотики активизируют локальные макрофаги, повышая презентацию антигена В-лимфоцитам и повышая продукцию секреторного иммуноглобулина А, модулируют цитокиновый профиль и вызывают толерантность к пищевым антигенам. Кроме того, пробиотики способствуют пищеварению и конкурируют за питательные вещества с патогенами. Они изменяют значение рН в кишечнике, создавая тем самым неблагоприятную окружающую среду для патогенов, и вырабатывают бактериоцины для их ингибирования. Пробиотики уничтожают активные формы кислорода, стимулируют

эпителиальную продукцию муцина, усиливают кишечную барьерную функцию и нейтрализуют действие токсинов, вырабатываемых патогенами.

Пребиотики представляют собой функциональные кормовые добавки в виде комплекса неперевариваемых сложноуглеводных пищевых волокон, которые не перевариваются в верхних отделах ЖКТ, но расщепляются в толстом отделе кишечника присутствующими там полезными бактериями, стимулируя их рост. Основными видами пребиотиков являются ди- и трисахариды, олиго- и полисахариды, и наиболее распространены фруктаны, особенно инулин, и фруктоолигосахариды. Пребиотики показаны при заболеваниях, связанных с дисбиозом, однако, прежде чем начинать их скармливание, необходимо определить вид пребиотика и подтвердить его эффективность [11].

Симбиотики представляют собой комбинацию пробиотиков и пребиотиков, в которой они взаимно усиливают воздействие на физиологические функции и процессы обмена веществ организма. За счет присутствующих в симбиотических препаратах *пробиотиков* стимулируется собственная полезная микрофлора кишечника. В составе полезных микроорганизмов, как правило, присутствуют лакто- и бифидобактерии. В составе *пребиотической* части присутствуют моносахара широкого спектра, стимулирующие приживаемость и рост заселяемой микрофлоры [12, 24]. Поскольку в результате скармливания симбиотиков полезные бактерии поставляются в организм сразу с «питанием» для них, такое сочетание позволяет пробиотику более быстро и

полноценно оказывать полезный эффект. Вследствие этого при скармливании симбиотиков может угнетаться рост других видов микроорганизмов за счет более высокого биологического потенциала и быстрого размножения. На рынке кормовых добавок предлагается несколько симбиотических препаратов, также нуждающихся в предварительной проверке их эффективности [10, 14].

Адсорбенты – это минеральные или органические вещества различной природы, предназначенные для нейтрализации микотоксинов в кормах. Адсорбенты связывают микотоксины, не давая им всасываться в кровь и выводят их из организма в неизменном виде. Нейтрализуя микотоксины, адсорбенты обеспечивают безопасность корма – один из важнейших факторов поддержания здоровья и высокой продуктивности животных [3].

Классический адсорбент включает в себя комплекс активных минеральных и органических веществ – сорбентов, например, гуминовых кислот и препаратов на основе дрожжей. Цеолиты, такие как тестосиликаты, клиноптилолиты и др., обладают самой высокой эффективностью связывания афлатоксина и фумонизина. Изучается возможность применения в качестве адсорбентов алюмосиликатов (вермикулита, сепиолита, каолинита) и тестосиликатов (клиноптилолита, цеолита, полевого шпата, кварца). Минеральные вещества (тестосиликаты и филлосиликаты) в сочетании с компонентами, выделенными из дрожжевой клеточной стенки, эффективно сорбируют афлатоксин, охратоксин, фумонизин и зеараленон. Специальный компонент на основе

бетаина, обладающий гепатопротекторной функцией и поддерживающий целостность кишечного эпителия, нейтрализует последствия воздействия дезоксиниваленола и Т-2 токсина.

К числу природных минеральных адсорбентов относится также шунгит, который способен не только сорбировать токсины, но и оказывает противовоспалительное и антигистаминное действие, способствуя повышению резистентности организма. Входящий в состав шунгита фуллереноподобный углерод, накапливаясь в печени, защищает ее от токсических воздействий, ускоряет нейтрализацию токсинов, что свидетельствует о его активном гепатопротекторном действии. Предполагается, что шунгит способен поглощать кислород, являясь сильным восстановителем, и может использоваться в качестве антиоксиданта наравне с витаминами Е и С [3, 15].

Иммуномодуляторы представляют собой препараты животного, микробного или синтетического происхождения, способные оказывать регулирующее действие на иммунную систему. По характеру влияния на иммунную систему их подразделяют на иммуностимулирующие и иммуносупрессивные. Наиболее значимыми являются биологические иммуностимулирующие вещества и препараты, такие как интерлейкины, лимфокины, интерфероны, биологически активные пептиды и полисахариды некоторых грибов, обладающие специфической способностью стимулировать иммунные процессы и активировать иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты) и дополнительные факторы иммунитета (макрофаги и др.).

Способность этих препаратов повышать резистентность организма и ускорять процессы регенерации послужила основанием для применения их в практике современного птицеводства в целях улучшения профилактики инфекционных, воспалительных и других заболеваний.

К синтетическим иммуностимуляторам относятся левамизол и ряд пептидных иммуностимуляторов – альфа-глутамил-триптофан и др. Их активность обусловлена способностью воздействовать на метаболизм клеток и тканей организма и активировать иммунокомпетентные клетки.

Полиоксидоний, также относящийся к группе иммуномодулирующих средств, обладает широким спектром биологической активности, повышает резистентность организма к бактериальным, грибковым и вирусным инфекциям, стимулирует гуморальный иммунный ответ, кооперацию Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарную активность макрофагов, повышает устойчивость мембран эритроцитов и активирует факторы врожденного иммунитета. Он также способствует восстановлению иммунных реакций при вторичных иммунодефицитных состояниях, вызванных инфекциями различной этиологии, травмами, ожогами, злокачественными новообразованиями и осложнениями после хирургических операций или применения химиотерапевтических средств, в том числе цитостатиков и стероидных гормонов. Наряду с иммуномодулирующим действием, полиоксидоний в форме раствора для ветеринарных целей обладает выраженной детоксикационной и антиоксидантной активностью, которая

определяется структурой и высокомолекулярной природой препарата. Препарат повышает устойчивость мембран клеток к цитотоксическому действию лекарственных препаратов и химических веществ, снижая их токсичность.

На российском рынке биологически активных добавок широко представлены различные группы препаратов, к каждому из которых прилагается большой перечень показателей, улучшающихся при скармливании данного препарата, однако за счет каких конкретно факторов у птицы повышается продуктивность, стрессоустойчивость и резистентность к заболеваниям, как правило, не уточняется. На этот вопрос помогает ответить изучение экспрессии конкретных генов, отвечающих за интересующий показатель [21].

Глава 2. Методы отбора образцов для исследований и оценки экспрессии генов

Поскольку исследования экспрессии генов осуществляют на уровне изучения матричной РНК (мРНК), для снижения потерь последней в образцах и возможных ошибок всего анализа необходимо провести отбор и фиксацию тканей в течение 15–20 минут после убоя птицы.

Извлечение тканей проводят чистыми инструментами, предварительно обработанными препаратом RNaseZAP™ для удаления с поверхности РНКаз.

Размер каждого образца не должен превышать 5 мм в любом из измерений, при массе не более 100 мг. Немедленно после

извлечения образец помещают в эппендорф объемом 1,5–2,0 мл с предварительно налитым фиксатором типа RNAlater или в жидкий азот. Образцы в фиксаторе RNAlater можно транспортировать без специальных средств, а далее хранить в холодильнике при температуре +3-8 °С в течение 30-40 суток. Если образцы были заморожены в жидком азоте, то далее они нуждаются в постоянном хранении при температуре -80 °С.

Тотальную РНК из образцов тканей и органов выделяют с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводят при помощи набора iScript RT Supermix (BioRad, США). Реакцию амплификации с праймерами, специфичными для изучаемых генов, проводят при помощи набора Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Все вышеописанные процедуры можно выполнять с использованием других имеющихся на рынке наборов реагентов с аналогичными свойствами.

Для определения конкретного влияния добавки на компоненты продуктивности нужно произвести отбор тканей матки, яйцевода, воронки яйцевода или других органов в контрольной и опытных выборках кур (по 3-6 голов). Для выделения РНК всех образцов должен использоваться один и тот же набор реактивов, иначе количество и качество РНК может оказаться различным.

После выделения тотальной РНК необходимо оценить ее качество и количество. Количественная оценка РНК осуществляется на приборе Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) или аналогичном и позволяет определить, насколько успешно прошло ее выделение. Однако в клетках эукариот содержится большое количество различных типов РНК, в первую очередь, рибосомной РНК (рРНК), в то время как для исследований экспрессии генов требуется только мРНК, считанная с кодирующих генных последовательностей ДНК. Для определения качества РНК применяют стандартный гель-электрофорез или его усовершенствованный вид на чипе биоанализатора, исходя из предположения о том, что по количеству и качеству рРНК можно опосредованно судить об этих же свойствах мРНК (рис. 1).

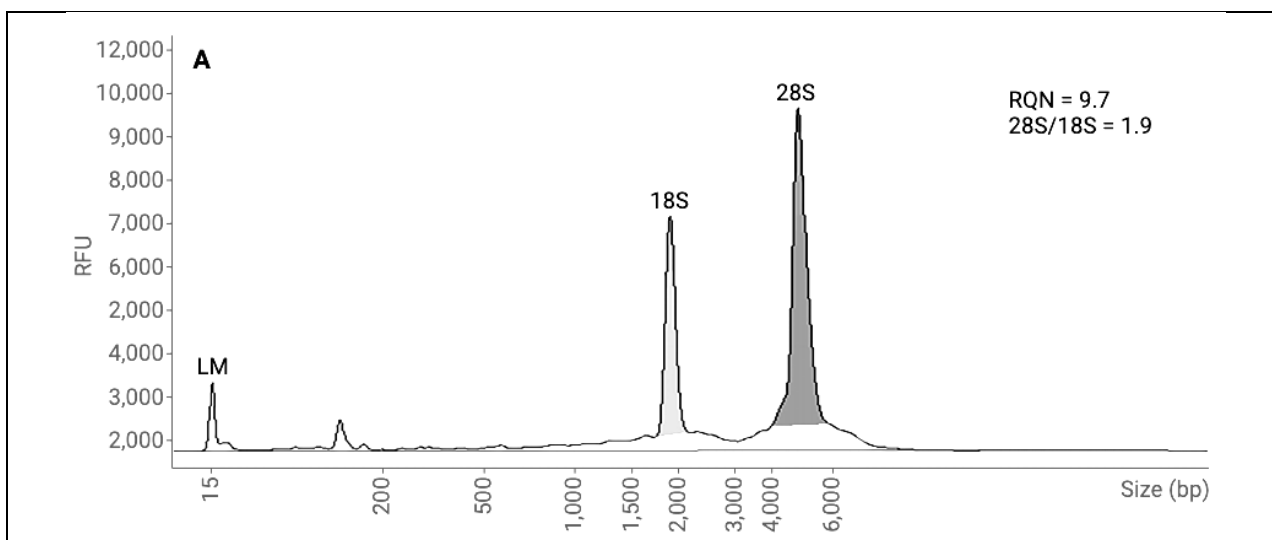


Рис. 1. Электрофореграмма качественного образца РНК с двумя четкими пиками рРНК, кодирующей субчастицы 18S и 28S [28]. LM – пик низкомолекулярного маркера; ось y – величина флуоресценции (в единицах относительной флуоресценции – RFU); ось x – размер РНК (в парах оснований – bp); RQN = 9,7 – число качества РНК, эквивалентное также числу целостности РНК (RIN) и измеряемое в пределах от 1 (РНК очень плохого качества) до 10 (РНК очень хорошего качества); 28S/18S = 1,9 – соотношение рРНК субчастиц 18S и 28S, имеющее в норме значения от ~2,0 до 2,7.

Даже на фореграмме обычного гель-электрофорезе можно выявить наличие молекул рРНК, кодирующих рибосомные субчастицы 18S и 28S, и оценить их состояние [16]. Определение на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc., США) дает более точную картину при тестировании каждой пробы. На рисунке 1 показан пример того, как должен выглядеть качественный образец РНК на электрофореграмме, получаемой с помощью биоанализатора.

При определении качества РНК важным показателем является соотношение 28S рРНК к 18S рРНК, которое указано в правом верхнем углу рисунка 1 (при норме этого значения около 2 и более). Как видно на приведенном примере, соотношение 28S/18S равно 1,9, что является показателем качественной и пригодной для дальнейшей работы РНК. При этом первый пик на графике – маркер (внутренний контроль); основной график представлен двумя четкими пиками, соответствующими 18S рРНК (более низкий пик, ~2000 пар оснований) и 28S рРНК (более высокий пик, ~5000 пар оснований) [28].

На рисунке 2 приведены результаты оценки РНК низкого качества.

Как видно на рисунке 2, в растворе присутствуют короткие «обрывки» деградированной РНК, наблюдаемые в левой части графика до пика маркера, который на оси x , отображающей в данном случае время анализа, соответствует приблизительно 16-й секунде, а также после него. Имеются также пики для 18S рРНК (на 30-й секунде) и 28S рРНК (на 35-й секунде). Указана также

концентрация РНК (60 ng/μl). При этом соотношение 28S/18S равно 0. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данный образец РНК поврежден и деградирован во время и после выделения и не годится для дальнейших исследований.

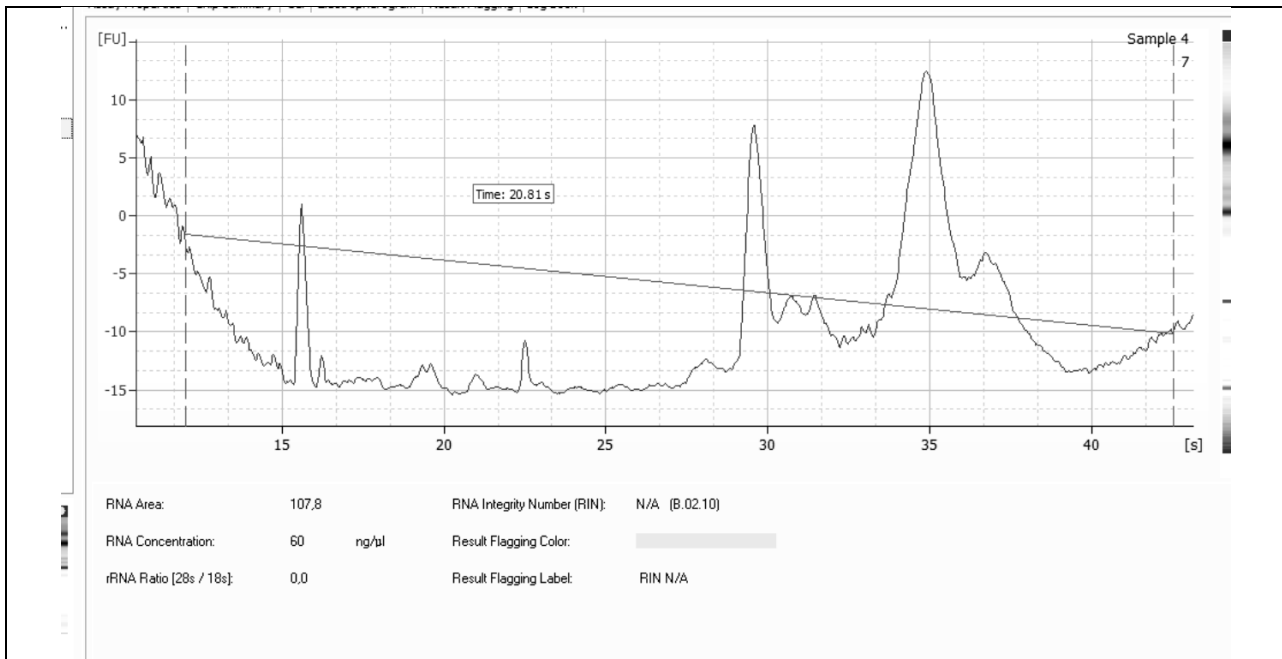


Рис. 2. Электрофореграмма образца РНК низкого качества. Ось y – величина флуоресценции (в единицах флуоресценции – FU); ось x – время анализа (в секундах). Число целостности РНК (RIN) в этом случае вообще невозможно измерить (N/A – not available); $28S/18S = 0$.

Полученную тотальную РНК каждого образца при помощи набора реактивов для обратной транскрипции и термостата переводят в кДНК для дальнейшего анализа на амплификаторе.

Для проведения правильных и достоверных исследований по экспрессии какого-либо гена все образцы по одному виду ткани разносят в одну плашку для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и каждый образец изучают в трех повторностях, при этом в качестве внутреннего контроля анализируют экспрессию референсного гена «домашнего

хозяйства», в качестве которого можно взять ген ТАТА-связывающего белка (*TBP*).

Полученные результаты обрабатывают статистически, результаты переносят в электронные таблицы Excel. Сначала определяют среднее значение специфического показателя *Ct* (порога числа циклов, наблюдаемого в реакционной смеси по мере накопления флуоресценции) для каждого гена внутри группы кур, а затем находят разницу между этими значениями у референсного и изучаемого гена (ΔCt). Если проводится сравнение с контрольной группой, то нужно найти разницу между значениями ΔCt в опытной и контрольной группах ($\Delta\Delta Ct$), и изменение в экспрессии искомого гена будет равно $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [26].

Однако, если требуется найти индивидуальные показатели экспрессии, то следует находить ΔCt между референсным и искомым геном у каждой особи и затем определять изменение индивидуальной экспрессии как $2^{-\Delta Ct}$ [29]. В этом случае для всех измерений можно посчитать ошибку среднего значения ΔCt и *t*-критерий Стьюдента, который будет свидетельствовать о достоверности изменений экспрессии генов в опыте.

Глава 3. Экспрессия генов продуктивности и устойчивости яичной птицы

Изучение яичной продуктивности кур можно проводить посредством анализа определенных генов, так или иначе связанных с ней (табл. 1). Из биологии размножения птиц известно, что яйцо птицы – высокодифференцированная половая клетка, содержащая

все питательные вещества, необходимые для развития будущего птенца. Яичная скорлупа состоит из шести слоев, и внутреннее строение яйца может иметь массу различных характеристик, включая плотность и состав белка, содержание питательных и иммунных веществ в желтке и т. д. [2, 23]. Морфология и химический состав яйца зависят от многих факторов, которые регулируются на генетическом уровне. Процесс формирования яйца очень сложен и требует реализации наследственной информации большого числа генов [31, 33].

Таблица 1. Примеры генов, ассоциированных с яичной продуктивностью

Ген	Название	Характеристика
<i>RARRES1</i> (OCX-32)	респондер 1 ретиноевой кислоты 1 (овокаликсин-32)	Белок матрицы, который содержится в наружных слоях скорлупы и в кутикуле.
<i>BPIFB3</i> (OCX-36)	представитель 4 ВРІ фолд-содержащего семейства В (овокаликсин-36)	Является геном-кандидатом для факторов, которые участвуют в минерализации оболочки яйца.
<i>MEPE</i> (OC-116)	фосфогликопротеин внеклеточного матрикса (овоклеидин-116)	Белок минерализации костей и скорлупы.
<i>CA2</i>	карбоангидраза-2	Фермент, участвующий в метаболизме кальция (образовании CaCO ₃).
<i>CYP26A1</i>	цитохром P450, семейство 26, подсемейство А, полипептид 1	Ген-кандидат, который может быть связан с образованием яйца и яйцекладкой.

<i>PRL</i>	пролактин	Гормон, который, как правило, считается решающим для начала и поддержания полового созревания у птиц и таким образом играет определяющую роль в производстве яиц.
<i>NPY</i>	нейропептид Y	Модулирует выделение гонадотропина и половое поведение.
<i>GnRHR</i>	рецептор гонадотропин-рилизинг-гормона	Участвует в регуляции образования яиц и эндокринном контроле воспроизводства яиц.
<i>GnRH</i>	гонадолиберин, или гонадотропин-рилизинг-гормон	Ген-кандидат, ответственный за синтез и высвобождение лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона у кур.

В таблице 1 приведены лишь некоторые гены, которые кодируют белки яйца и гормоны, связанные с овуляцией и ростом фолликулов. Эти гены являются наследственными факторами, ответственными за синтез белков, которые влияют на качественные и количественные показатели продуктивности кур-несушек, таких как масса яиц, яйценоскость, упругая деформация скорлупы яйца, толщина скорлупы и т. д. [27]. Подобными генами контролируется синтез таких белков, как овокаликсин-32 (ОСХ-32), овокаликсин-36 (ОСХ-36), овоклеидин-116 (ОС-116), а также рецептор липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR), вителлогенин

(VTG), рибофлавин-связывающий белок (RBP), клеточные ретинол-связывающие белки (CRBPs), авидин(AVD), овальбумин (OVAL), кальбиндин-1 (CALB1, или CaBP-D28k) и т. д. При применении различных биологически активных добавок можно проверять экспрессию именно тех генов, на которые ожидается влияние [22].

В таблице 2 приведены некоторые гены, связанные с резистентностью и иммунитетом птицы.

Таблица 2. Примеры генов, ассоциированных с устойчивостью кур к заболеваниям

Ген	Название	Характеристика
<i>AvBD9</i> (<i>Gal-9</i>)	бета-дефензин-9 (галлинацин-9)	Катионный пептид иммунной системы (из группы морфиноподобных генов), который участвует в антимикробной защите организма, подавлении болевой и воспалительной реакций.
<i>AvBD10</i> (<i>Gal-10</i>)	бета-дефензин-10 (галлинацин-10)	Бета-дефензин, способный вырабатывать устойчивость против грамотрицательных и грамположительных бактерий и стимулировать приобретенный иммунный ответ против патогенов.
<i>PENK</i>	проэнкефалин	Участвует в выработке опиоидных пептидов при воспалении; опиоидные рецепторы находятся в периферических терминалях сенсорных нейронов и подвергаются усиленной активации при воспалении.
<i>IL8</i>	интерлейкин-8	Белок класса цитокинов и маркер хронических и острых воспалений, вызывающий направленную миграцию нейтрофилов и лимфоцитов в очаг воспаления.

Для определения влияния кормовой добавки на конкретную характеристику продуктивности (качество скорлупы, плотность яйца, содержание сухого вещества в яйце, массу яиц, яйценоскость и др.) или иммунитета (стрессоустойчивость, бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), устойчивость к заболеваниям и т. д.) необходимо установить, экспрессия какого гена изменилась. В этом случае следует точно понимать, в какой ткани ген экспрессирует лучше и могут ли другие факторы искажать результат.

При наличии нескольких тканей оптимальным признается результат в том органе или ткани, где наблюдаются наиболее однородные результаты между курами одной группы. В какой ткани следует оценивать экспрессию данного гена в ответ на воздействие какого-либо стресс-фактора, изначально может быть неясно. Известно, что под влиянием факторов, вызывающих состояние стресса, иммунциты начинают секретировать опиоиды [32]. Эти пептиды активируют периферические опиоидные рецепторы и вызывают чувство анальгезии, подавляя избыточное возбуждение сенсорных нейронов и облегчая выделение нейропептидов. Например, при исследовании гена проэнкефалина (*PENK*), ответственного за выработку опиоидных пептидов при воспалении, у каждой изучаемой особи нами были отобраны по четыре ткани – матка, печень, тонкий кишечник и слепые отростки (табл. 3).

В каждой ткани была проведена оценка экспрессии генов методом количественной ПЦР с использованием флуоресцентного

красителя SYBR Green. При определении разницы ΔC_t между порогами числа циклов, наблюдаемыми по мере накопления флуоресценции для искомого гена и референсного (гена «домашнего хозяйства» – ТАТА-связывающего белка, *TBP*) был обнаружен разброс между ΔC_t внутри каждой группы. В зависимости от ткани разброс внутри каждой изучаемой группы составил от 0,02 до 15,5 циклов (в таблице 3 значения разброса в 4 и более циклов отмечены жирным шрифтом).

Таблица 3. Оценка экспрессии гена проэнкефалина (PENK) в тканях кур (TBP – референсный ген TATA-связывающего белка)

Группы и показатели	Ткани											
	Матка			Печень			Тонкий кишечник			Слепые отростки		
	Ct TBP	Ct PENK	$\Delta Ct (Ct PENK - Ct TBP)$	Ct TBP	Ct PENK	$\Delta Ct (Ct PENK - Ct TBP)$	Ct TBP	Ct PENK	$\Delta Ct (Ct PENK - Ct TBP)$	Ct TBP	Ct PENK	$\Delta Ct (Ct PENK - Ct TBP)$
Контроль	26,03	21,42	-4,61	24,1	25,82	1,72	25,02	22,8	-2,22	27,06	23,83	-3,23
	25,54	22,91	-2,63	25,63	25,45	-0,18	25,12	23,6	-1,52	25,75	21,75	-4
	25,8	22,03	-3,77	22,55	26,39	3,84	24,71	21,94	-2,77	26,38	22,8	-3,58
Разница в ΔCt		1,98	4,02			1,25						-0,77
Опыт 1	24,9	19,39	-5,51	27,5	25,39	-2,11	25,13	22,17	-2,96	24,35	21,52	-2,83
	24,66	23,4	-1,26	28,5	27,5	-1	24,11	22,19	-1,92	24,54	22,3	-2,24
	24,8	21,2	-3,6	26,37	23,2	-3,17	26,09	22,17	-3,92	24,47	21,87	-2,6
Разница в ΔCt		4,25			2,17				2			0,59
Опыт 2	24,02	19,92	-4,1	29,82	28,38	-1,44	27,4	27,98	0,58	26,05	21,84	-4,21
	24,23	23,28	-0,95	31,05	21,74	-9,31	25,94	24,81	-1,13	25,77	22,07	-3,7
	24,42	21,61	-2,81	28,75	35	6,25	28,9	31,21	2,31	25,92	21,97	-3,95
Разница в ΔCt		3,15	15,56			15,56			3,44			0,51
Опыт 3	25,9	21,78	-4,12	26,4	27,87	1,47	27	25,54	-1,46	25,36	23,1	-2,26
	24,86	23,1	-1,76	27,23	32,56	5,33	27,5	28,36	0,86	24,8	22,23	-2,57
	25,58	21,9	-3,68	25,56	23,2	-2,36	26,48	22,83	-3,65	25,11	22,69	-2,42
Разница в ΔCt		2,36				7,69			4,51			0,31
Опыт 4	23,64	21,69	-1,95	26,94	25,59	-1,35	25,58	23,37	-2,21	30,73	19,04	-11,69
	25,57	20	-5,57	26,83	25,48	-1,35	25,49	23,28	-2,21	29,5	20,2	-9,3
	24,23	20,2	-4,03	27,02	25,55	-1,47	25,6	23,41	-2,19	30,06	19,7	-10,36
Разница в ΔCt		3,62				0,12			0,02			-2,39

Безусловно, разброс более 2 циклов амплификации между изучаемыми особями серьезно влияет на результат анализа экспрессии генов и может быть связан не с дачей какого-либо препарата, а с внешними факторами. Поэтому в тех тканях, где разброс по ΔC_t внутри одной группы птиц минимальный, мы можем предполагать минимальное влияние других факторов на этот ген и, следовательно, анализ действия какого-либо препарата следует проводить именно в таких тканях. Как видно из таблицы 3, в описанном случае оптимальной тканью для дальнейших исследований оказались слепые отростки.

Стрессоустойчивость и продуктивность тесно связаны между собой, и эти параметры можно изучать на генетическом уровне, так как известны гены, активность которых вносит свой вклад в формирование этих признаков.

В результате оценки экспрессии генов гормона пролактина (*PRL*) и рецептора гонадотропин-рилизинг-гормона (*GNRHR*), которые играют важную роль в формировании фолликулов, нами было установлено, что между менее и более стрессоустойчивыми особями существуют достоверные различия в уровне экспрессии этих генов. Данная гипотеза была также проверена нами на примере генов гонадотропин-рилизинг-гормона (*GNRH*), овальбумина (*OVAL*) и овокаликсина-32 (*RARRES1*, или *OCX-32*).

Было установлено, что для реализации генетического потенциала и, в частности, для улучшения продуктивности и стрессоустойчивости кур при скормливании добавок ожидается,

чтобы у генов гонадотропин-рилизинг-гормона и овокаликсина-32 было понижение экспрессии, а у гена овальбумина – повышение.

В то же время ген, кодирующий гормон пролактин, экспрессировал только в ткани матки низкопродуктивных кур, из чего следует, что к моменту исследования у высокопродуктивных кур уже закончилась выработка пролактина.

Глава 4. Влияние фитобиотиков на экспрессию генов

В ряде источников указано, что фитобиотики могут способствовать повышению продуктивности и восстановлению здоровья у животных. Использование фитобиотиков позволяет снизить или даже полностью исключить антибиотики из лечебных и профилактических программ птицеводческих хозяйств. Эфирные масла, входящие в состав фитобиотиков, препятствуют возникновению респираторных заболеваний и уменьшают падеж птицы [12].

Для принятия решения о применении в кормлении птицы того или иного фитобиотика с целью повышения ее иммунитета или продуктивности следует проверить, на экспрессию каких генов оказывает влияние конкретный препарат. Например, при оценке действия фитобиотика **Интебио**[®] нами было установлено увеличение экспрессии генов проэнкефалина (*PENK*) и овальбумина (*OVAL*). Результаты опытов приведены в таблицах 4 и 5 [14].

Таблица 4. Уровень экспрессии гена проэнкефалина (PENK) в слепых отростках кур в ответ на фитобиотик Интебио® (TBP – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группы и показатели	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>PENK</i>	ΔCt (Ct <i>PENK</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta\Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Контроль	27,06	23,83	-3,62	0	1
	25,75	21,75			
	26,38	22,8			
X среднее	26,41	22,79			
Фитобиотик Интебио®	26,05	21,84	-3,96	-0,34	1,27
	25,77	22,07			
	25,92	21,97			
X среднее	25,91	21,95			

Таблица 5. Уровень экспрессии гена овальбумина (OVAL) в слепых отростках кур в ответ на фитобиотик Интебио® (TBP – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группы и показатели	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>OVAL</i>	ΔCt (Ct <i>OVAL</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta\Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Контроль	25,76	30,6	4,76	0	1
	26,03	32			
	25,54	29,09			
X среднее	25,79	30,55			
Фитобиотик Интебио®	25,23	28,13	2,94	-1,83	3,54
	24,25	27,39			
	26,17	28,9			
X среднее	25,21	28,16			

В слепых отростках после скармливания фитобиотика экспрессия проэнкефалина имела тенденцию к увеличению в 1,27 раза (табл. 4), что может свидетельствовать о повышении синтеза нейропептидов и анальгезии организма.

В таблице 5 приведены результаты влияния фитобиотика Интебио® на экспрессию гена овальбумина (*OVAL*) – основного белка яйца и подскорлупных оболочек. При этом наблюдалось увеличение экспрессии этого гена овальбумина в 3,54 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что при скармливании данного фитобиотика, наряду с антимикробным эффектом, наблюдается стимуляция синтеза овальбумина и можно ожидать повышения массы яйца.

Глава 5. Влияние пребиотиков на микрофлору и экспрессию генов

Целью ввода в корм пребиотических препаратов является желание улучшить рост полезной микрофлоры и снизить содержание нежелательной и патогенной микрофлоры. Улучшение работы пищеварительного тракта приводит к повышению уровня усвоения питательных веществ, что гарантирует высокую продуктивность птиц [30].

Зоотехнические опыты на ограниченном поголовье часто не дают достоверных различий в показателях продуктивности, в то время как исследования экспрессии компетентных генов и состава

микробиома могут дать дополнительную информацию об эффекте от скармливания пребиотиков. Например, при испытаниях нами пребиотика **Ветелакт** опытная группа кур достоверно не отличалась от контрольной группы по яйценоскости и массе яиц, хотя наблюдалась тенденция увеличения альфа-разнообразия микробного состава, которое экспериментально определяется по общему микробному числу (количеству обнаруженных операционных таксономических единиц). Результаты этих исследований приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Зоотехнические показатели опытной и контрольной групп кур при скармливании пребиотика Ветелакт

Группа	До начала опыта (23–25 недель жизни)			За время опыта (26–29 недель жизни)		
	Средняя масса яиц, г	Количе- ство яиц, шт.	Интен- сивность яйцеклад -ки, %	Средняя масса яиц, г	Количе- ство яиц, шт.	Интен- сивность яйцеклад -ки, %
Кон- троль	54,04± 0,72	28,39± 2,04	95,23± 0,82	58,53± 0,37	21,47± 0,23	93,35± 0,48
Вете- лакт	52,35± 1,18	27,69± 1,98	95,26± 0,83	58,79± 0,46	21,38± 0,29	92,93± 0,61

Таблица 7. Общее микробное число у птицы опытной (ОГ-1) и контрольной (К) групп при скармливании пребиотика Ветелакт

№ курицы	Общее микробное число	№ курицы	Общее микробное число
Контроль		Ветелакт	
1К	$4,589 \times 10^7$	1ОГ-1	$5,094 \times 10^7$
2К	$3,799 \times 10^7$	2ОГ-1	$2,407 \times 10^7$
3К	$5,472 \times 10^7$	3ОГ-1	$2,927 \times 10^7$
4К	$5,803 \times 10^7$	4ОГ-1	$4,162 \times 10^7$
5К	$1,883 \times 10^6$	5ОГ-1	$6,525 \times 10^7$
Среднее	$(3,970 \pm 2,25) \times 10^7$	Среднее	$(4,223 \pm 1,66) \times 10^7$

Известно, что микрофлора кишечника на 60–70% ответственна за формирование иммунитета у птицы. Исследование экспрессии генов позволило нам сделать заключение о направленном действии Ветелакта на определенные иммунные факторы.

В таблицах 8–11 приведены данные по экспрессии генов иммунитета у кур-несушек, получавших Ветелакт.

Как следует из полученных нами материалов по экспрессии генов, связанных с иммунитетом, экспрессия бета-дефензина-9 (*AvBD9*) снизилась в 5 раз, проэнкефалина (*PENK*) выросла почти в 2 раза, бета-дефензина-10 (*AvBD10*) – почти в 1,5 раза, а интерлейкина-8 (*IL8*) почти не изменилась.

Эндогенные антимикробные пептиды являются важными компонентами иммунной системы птиц. Они играют ключевую роль в обеспечении первой линии защиты организма от инфекции.

Таблица 8. Экспрессия гена бета-дефензина-9 (*AvBD9*) в слепых отростках кур в ответ на пребиотик Ветелакт (*TBP* – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группа	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>AvBD9</i>	ΔCt (Ct <i>AvBD9</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	28,6	32,61	4,01	0	1
	25,08	24,46	-0,62		
	24,33	31,72	7,39		
	25,61	28,58	2,97		
X среднее	25,91	29,34	3,44		
Опыт (Ветелакт)	24,45	31,07	6,62	2,31	0,20
	25,85	31,61	5,76		
	23,88	31,00	7,12		
	25,20	28,70	3,50		
X среднее	24,85	30,60	5,75		

Таблица 9. Экспрессия гена проэнкефалина (*PENK*) в слепых отростках кур в ответ на пребиотик Ветелакт (*TBP* – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группа	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>PENK</i>	ΔCt (Ct <i>PENK</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	28,6	25,31	-3,29	0	1
	25,08	22,46	-2,62		
	24,33	21,67	-2,66		
	25,61	21,07	-4,54		
X среднее	27,22	22,22	-3,28		

Опыт (Ветелакт)	24,45	21,16	-3,29	-0,93	1,91
	25,85	21,06	-4,79		
	23,88	21,21	-2,67		
	25,2	19,12	-6,08		
Х среднее	24,85	20,64	-4,21		

Таблица 10. Экспрессия гена бета-дефензина-10 (*AvBD10*) в слепых отростках кур в ответ на пребиотик Ветелакт (*ACTB* – референсный ген бета-актина)

Группа	Ct <i>ACTB</i>	Ct <i>AvBD10</i>	ΔCt (Ct <i>AvBD10</i> – Ct <i>ACTB</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализован ное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	16,2	21,65	5,45	0	1
	17,44	21,82	4,38		
	14,62	21,59	6,97		
	16,22	20,84	4,62		
Х среднее	16,99	21,28	5,36		
Опыт (Ветелакт)	15,29	20,97	5,68	-0,56	1,48
	17,32	21,03	3,71		
	14,78	21,28	6,5		
	15,75	19,02	3,27		
Х среднее	15,785	20,575	4,79		

Таблица 11. Экспрессия гена интерлейкина-8 (*IL8*) в слепых отростках кур в ответ на пребиотик Ветелакт (*ACTB* – референсный ген бета-актина)

Группа	Ct <i>ACTB</i>	Ct <i>IL8</i>	Δ Ct (Ct <i>IL8</i> – Ct <i>ACTB</i>)	$\Delta\Delta$ Ct (Δ Ct опыт – Δ Ct контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta\Delta$ Ct)
Контроль	16,2	23,33	7,13	0	1
	17,44	24,29	6,85		
	14,62	22,75	8,13		
	16,22	22,42	6,2		
X среднее	16,99	23,19	7,08		
Опыт (Ветелакт)	15,29	23	7,71	0,13	0,92
	17,32	24,62	7,3		
	14,78	23,23	8,45		
	15,75	21,1	5,35		
X среднее	15,79	22,99	7,20		

Антимикробные пептиды действуют путем нарушения структуры или функции клеточной мембраны микроорганизмов. В настоящее время охарактеризованы сотни антимикробных пептидов, которые выявляются в эпителиальных тканях, фагоцитирующих клетках и биологических жидкостях многих многоклеточных животных – от моллюсков до человека. Дефензины представляют собой низкомолекулярные (3,5–6,0 кДа) катионные негликозилированные пептиды, которые способны обезвреживать широкий спектр патогенов, включающий разнообразные бактерии, грибы, а также оболочечные вирусы. Данные антимикробные пептиды кодируются генами, которые у

птиц образуют большое семейство генов бета-дефензинов. К этому семейству относятся гены *AvBD9* и *AvBD10* [5].

Полученные нами результаты наглядно показывают, что скормливание Ветелакта стимулирует выработку белков проэнкефалина и бета-дефензина-10.

Глава 6. Влияние пробиотиков на экспрессию генов

Основное действие пробиотиков направлено на улучшение иммунного статуса организма, обуславливающего функционирование факторов врожденного и приобретенного иммунитета, формирование общей резистентности и стрессоустойчивости организма. Поэтому эффекты всех рекомендуемых для этих целей пробиотических препаратов необходимо изучать более пристально. Для примера рассмотрим действие препарата **Профорт[®]**, бактериальный комплекс которого состоит из двух штаммов бактерий, способных к синтезу молочной кислоты и цианкобаламина (витамина В₁₂). Данный пробиотик может иметь положительный эффект на показатели продуктивности – яйценоскость и массу яиц, что показывает и наблюдавшаяся нами сопряженная увеличенная экспрессия генов овальбумина (*OVAL*) и овокаликсина-36 (*OCX-36*) в результате скормливания препарата [25]. Однако при проведении оценки экспрессии генов, связанных с иммунитетом, ни по одному из изучаемых генов достоверного повышения не отмечалось. Результаты оценки экспрессии генов овокаликсина-36, бета-дефензина-9 (*AvBD9*) и интерлейкина-8 (*IL8*) приведены в таблицах 12–14.

Как следует из приведенных результатов исследований, экспрессия гена минерализации скорлупы – овокаликсина-36 выросла в 1,99 раза после скармливания курам пробиотической кормовой добавки, однако экспрессия генов бета-дефензина-9 и интерлейкина-8 снизилась в 3,3 и 1,6 раза, соответственно.

На основании этих данных можно предположить, что использование пробиотических добавок может оказывать различный эффект на иммунные факторы и гены, их контролируемые.

Таблица 12. Экспрессия гена овокаликсина-32 (ОСХ-36) в матке кур в ответ на пробиотик (ТВР – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группа	Ct <i>ТВР</i>	Ct <i>ОСХ-36</i>	ΔCt (Ct <i>ОСХ-36</i> – Ct <i>ТВР</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализован ное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	28,6	15,72	-12,88	0	1
	25,08	16,18	-8,9		
	24,33	15,46	-8,87		
	25,61	17,01	-8,6		
X среднее	25,91	16,09	-9,81		
Опыт (Профорт)	23,16	13,65	-9,51	-0,99	1,99
	22,26	11,24	-11,02		
	24,55	12,18	-12,37		
	21,38	11,07	-10,31		
X среднее	22,84	12,04	-10,80		

Таблица 13. Экспрессия гена бета-дефензина-9 (*AvBD9*) в слепых отростках кур в ответ на пробиотик (*TBP* – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группа	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>AvBD9</i>	ΔCt (Ct <i>AvBD9</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	28,6	32,61	4,01	0	1
	25,08	24,46	-0,62		
	24,33	31,72	7,39		
	25,61	28,58	2,97		
X среднее	25,91	29,34	3,44		
Опыт (Профорт)	23,16	24,71	1,55	1,75	0,30
	22,26	28,24	5,98		
	24,55	28,05	3,5		
	21,38	31,1	9,72		
X среднее	22,84	28,03	5,19		

Таблица 14. Экспрессия гена интерлейкина-8 (*IL8*) в слепых отростках кур в ответ на пробиотик (*ACTB* – референсный ген бета-актина)

Группа	Ct <i>ACTB</i>	Ct <i>IL8</i>	ΔCt (Ct <i>IL8</i> – Ct <i>ACTB</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	16,2	23,33	7,13	0	1
	17,44	24,29	6,85		
	14,62	22,75	8,13		
	16,22	22,42	6,2		
X среднее	16,99	23,19	7,08		

Опыт (Профорт)	14,05	22,46	8,41	0,63	0,64
	13,87	22,19	8,32		
	15,64	21,71	6,07		
	13,55	22,4	8,85		
	14,54	21,45	6,91		
X среднее	14,33	22,04	7,71		

Глава 7. Влияние адсорбентов на экспрессию генов

Адсорбенты играют особую роль в кормлении птицы. Их главная задача адсорбировать только вредные для птицы органические и минеральные токсины. Однако такая избирательная функция достаточно трудно «программируется» в живой природе. Все молекулы подходящей структуры и атомной массы остаются на минеральном фильтре сорбента. Производители кормов знают об этом недостатке и осуществляют дополнительный ввод витаминов в корм, с учетом их связывания в некоторой степени сорбентами.

Вопрос о том, стимулирует ли иммунитет препарат, который снижает уровень интоксикации микотоксинами, является очень важным и актуальным. Мы провели подобное исследование на примере адсорбента на основе минерала **шунгита**. Полученные результаты приведены в таблицах 15–17.

Результаты оценки экспрессии генов бета-дефензина-9 (*AvBD9*), проэнкефалина (*PENK*) и интерлейкина-8 (*IL8*) показали снижение экспрессии по всем указанным генам.

Таблица 15. Экспрессия гена бета-дефензина-9 (*AvBD9*) в слепых отростках кур в ответ на адсорбент (*TBP* – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группа	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>AvBD9</i>	ΔCt (Ct <i>AvBD9</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	28,6	32,61	4,01	0	1
	25,08	24,46	-0,62		
	24,33	31,72	7,39		
	25,61	28,58	2,97		
X среднее	25,91	29,34	3,44		
Опыт (шунгит)	23,11	30,95	7,84	2,50	0,18
	21,93	30,73	8,8		
	22,19	29,65	7,46		
	23,65	32,33	8,68		
X среднее	23,61	29,55	5,94		

Таблица 16. Экспрессия гена проэнкефалина (*PENK*) в слепых отростках кур в ответ на адсорбент (*TBP* – референсный ген ТАТА-связывающего белка)

Группа	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>PENK</i>	ΔCt (Ct <i>PENK</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	28,6	21,81	-6,79	0	1
	25,08	22,46	-2,62		
	24,33	21,67	-2,66		
	25,61	21,07	-4,54		
X среднее	25,91	21,75	-4,15		

Опыт (шунгит)	23,11	21,15	-1,96	2,05	0,24
	21,93	21,1	-0,83		
	22,19	21,2	-0,99		
	23,65	21,71	-1,94		
X среднее	23,15	21,05	-2,11		

Таблица 17. Экспрессия гена интерлейкина-8 (*IL8*) в слепых отростках кур в ответ на адсорбент (*ACTB* – референсный ген бета-актина)

Группа	Ct <i>ACTB</i>	Ct <i>IL8</i>	ΔCt (Ct <i>IL8</i> – Ct <i>ACTB</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt опыт – ΔCt контроль)	Нормализованное значение к контролю ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Контроль	16,2	23,33	7,13	0	1
	17,44	24,29	6,85		
	14,62	22,75	8,13		
	16,22	22,42	6,2		
X среднее	21,59	21,59	7,08		
Опыт (шунгит)	15,11	23,29	8,18	0,80	0,57
	13,86	19,96	6,1		
	13,05	22,16	9,11		
	13,64	22,35	8,71		
	14,31	21,59	7,28		
X среднее	13,99	21,87	7,88		

Заключение

Прежде чем начать широкое применение какого-либо препарата, содержащего биологически активные вещества или полезные микроорганизмы, необходимо иметь полное представление о влиянии скармливаемого препарата на компоненты продуктивности или иммунитета. Каким образом можно получить полную картину и оценить экономическую эффективность применения препарата, а также его биологическую безопасность, возможно установить на основании применения современных и инновационных методов молекулярно-генетических исследований, включая анализ экспрессии генов и микробного профиля. В данных практических рекомендациях описаны разработанные и апробированные в наших экспериментах методы оценки использования кормовых добавок для улучшения продуктивности и стрессоустойчивости яичной птицы.

Список литературы

1. Багно О.А., Прохоров О.Н., Шевченко С.А., Шевченко А.И., Дядичкина Т.В. Фитобиотики в кормлении сельскохозяйственных животных (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 4. С. 687–697.
2. Белая М.В., Лозовский А.Р. Оценка реализации генетического потенциала продуктивности кур-несушек кросса «Хайсекс Браун» // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2–1.
3. Боголюбова Н.В., Романов В.Н., Девяткин В.А., Калинин Ю.К. Использование минерала шунгит в рационах жвачных животных: методические рекомендации. Дубровицы: ФГБНУ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2017. 42 с.
4. Данилевская Н.В. Особенности применения антибиотиков в ветеринарной практике // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2010. № 3. С. 37–41.
5. Дубровин А.В., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Йылдырым Е.А., Кочиш И.И., Новикова О.Б. Влияние кормовой добавки на основе эфирных масел на здоровье и продуктивность цыплят кур // Ветеринария. 2018. № 12. С. 12–16.
6. Дубровин А.В., Ильина Л.А., Новикова О.Б. Влияние кормовой добавки на основе эфирных масел на яичную продуктивность и иммунный ответ кур-несушек при заражении эпизоотическим штаммом *Salmonella enteritidis* // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. 2019. № 1 (54). С. 107–111.
7. Дубровин А.В., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Йылдырым Е.А., Новикова О.Б., Кочиш И.И. Исследование влияния кормовых добавок на основе эфирных масел на иммунологические показатели крови кур-несушек // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 1. С. 163–165.

8. Егоров И.А., Ленкова Т.Н., Вертипрахов В.Г., Манукян В.А., Егорова Т.А., Грозина А.А., Свиткин В.С., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Никонов И.Н. Использование комплексного фитобиотика в комбикормах для молодняка СГЦ «Смена» // Птицеводство. 2017. № 12. С. 15–19.
9. Егоров И.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Егорова Т.А., Никонов И.Н., Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю. Замещение кормовых антибиотиков в рационах. Сообщение I. Микробиота кишечника и продуктивность мясных кур (*Gallus gallus* L.) на фоне энтеросорбента с фито- и пробиотическими свойствами // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 2. С. 280–290.
10. Имангулов Ш.А., Егоров И.А., Ленкова Т.Н., Игнатова Г.В., Паньков П.Н., Розанов Б.Л., Егорова Т.В., Харламов К.В., Елизаров И.В., Свиткин В.С., Кислюк С.М., Еремец В.И., Неминая Л.А., Гинсбург А.С., Фисинин В.И. Использование пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков в птицеводстве: методические рекомендации / Под. общ. ред. В.И. Фисинина, И.А. Егорова и Ш.А. Имангулова. Сергиев Посад: ВНИТИП, 2008. 43 с.
11. Йылдырым Е.А., Бражник Е.А., Ильина Л.А., Дубровин А.В., Филиппова В.А., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю. Современные биотехнологии в кормлении птицы // Птицеводство. 2019. № 5. С. 19–24.
12. Кочиш И.И., Мясникова О.В., Мартынов В.В. Влияние фитобиотика Интебио на экспрессию генов продуктивности и иммунитета у кур-несушек // Материалы Международной конференции «Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных». М.: Сельскохозяйственные технологии, 2019. С. 93–97.
13. Ланцева Н.Н., Мартыщенко А.Е., Швыдков А.Н., Рябуха Л.А., Смирнов П.Н., Котлярова О.В., Чебаков В.П. Влияние функциональных свойств пробиотиков и фитобиотиков на

- показатели продуктивности цыплят-бройлеров // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 2–7. С. 1417–1423.
14. Лаптев Г.Ю., Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Новикова Н.И., Тюрина Д.Г., Дубровин А.В., Кочиш И.И., Грозина А.А. Эффективность эфирных масел в птицеводстве. // *Сельскохозяйственные вести*. 2018. № 4. С. 32–33.
15. Новожилова О.А. Повышение эффективности производства яиц и мяса бройлеров на основе обогащения шунгитом комбикормов и питьевой воды для птицы: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.10; [Место защиты: Вологод. гос. молочно-хоз. акад. им. Н.В. Верещагина]. Вологда – Молочное, 2011. 192 с.
16. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
17. Пименов Н.В., Данилевская Н.В.
Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных от домашних голубей // *Ветеринария*. 2006. № 9. С.20–24.
18. Страчунский Л.С. Состояние антибиотикорезистентности в России // *Клиническая фармакология и терапия*. 2000. № 2. С. 6–9.
19. Федотов В.А., Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., Егоров И.А., Егорова Т.В. Фитобиотик в кормлении птицы // *Птицеводство*. 2018. № 8. С. 33–37.
20. Фисинин В.И. Мировые и российские тренды развития птицеводства//*Животноводство России*.- 2018.- №S3.- с.2-4.
21. Biswas A., Mohan N., Raza M., Mir N.A., Mandal A. Production performance, immune response and blood biochemical parameters in broiler chickens fed diet incorporated with prebiotics // *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2019. Vol. 103. No. 2. P. 493–500.
22. Bu G., Huang G., Fu H., Li J., Huang S., Wang Y. Characterization of the novel duplicated PRLR gene at the late-feathering K locus in Lohmann chickens // *Journal of Molecular Endocrinology*. 2013. Vol. 51. No. 2. P. 261–276.

23. Hincke M.T., Nys Y., Gautron J. The role of matrix proteins in eggshell formation // *The Journal of Poultry Science*. 2010. Vol. 47. No. 3. P. 208–219.
24. Jiang S., Mohammed A.A., Jacobs J.A., Cramer T.A., Cheng H.W. Effect of synbiotics on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress // *Poultry Science*. 2019. pii: pez571.
25. Kovacs-Nolan J., Cordeiro C., Young D., Mine Y., Hincke M. Ovocalyxin-36 is an effector protein modulating the production of proinflammatory mediators // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2014. Vol. 160. No. 1–2. P. 1–11.
26. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods*. 2001. Vol. 25. No. 4. P. 402–408.
27. Muramatsu T., Sanders M.M. Repression of ovalbumin gene expression in the chicken oviduct cell // *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Vol. 4: Proceedings of the Fourth Annual Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Fukuoka, Japan, 13–15 November 1991 / Eds. H. Murakami, S. Shirahata, H. Tachibana. Dordrecht: Springer, 1992. P. 445–451.
28. Pocernich C., Siembieda S. Quality metrics for nucleic acids with the Agilent Fragment Analyzer and Femto Pulse Systems // *Agilent Technologies Application Note*. 2019. Pub. No. 5994-0521EN. 4 p.
29. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by comparative Ct method // *Nature Protocols*. 2008. Vol.3. No. 6. P.1101–1108.
30. Shang Y., Kumar S., Oakley B., Kim W.K. Chicken gut microbiota: importance and detection technology // *Frontiers in Veterinary Science*. 2018. Vol. 5. P. 254.

31. Stefaniuk M., Kaczor U., Kulisa M. [MSTN gene polymorphism in livestock animals] // *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*. 2014. Vol. 68. P. 633–639.
32. Tu J., Qi K., Xue T., Wei H., Zhang Y., Wu Y., Zhou X., Lv X. Construction of recombinant *Pichia pastoris* carrying a constitutive AvBD9 gene and analysis of its activity // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 25. No.12. P. 2082–2089.
33. Wang J., Chen J., Zhang J., Gao B., Bai X., Lan Y., Lin P., Guo H., Gao Y., Xing B. Castration-induced changes in the expression profiles and promoter methylation of the GHR gene in Huainan male pigs // *Animal Science Journal*. 2017. Vol. 88. No. 8. P. 1113–1119.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Печатается в авторской редакции
Формат 60x90/16. Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Тираж 300 экз.

Издательство «Сельскохозяйственные технологии»
109472, Москва, ул. Ташкентская, д.34, корп. 4
Тел.: (495) 919-44-52, (495) 374-56-50
www.zoovetkniga.ru