**ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЖДУНАРОДНОЙ ЛАБОРАТОРИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ И ГЕНОМИКИ ПТИЦЫ ФГБОУ ВО МГАВМИБ – MBA ИМЕНИ К. И. СКРЯБИНА**

*Романов М.Н.,1,2 Кочиш И.И.,1 Селина М.В.1*

1ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

2Университет Кента, Кентербери, Великобритания;

E-mail: m.romanov@kent.ac.uk; selina.marinav@gmail.com

**Аннотация**

Рассматривается развитие исследований в международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы ФГБОУ ВО МГАВМиБ – MBA имени К. И. Скрябина в 2017-2020 годах. Приведены результаты основных научных исследований коллектива лаборатории достигнутых в ходе выполнения проекта по Договору № 14.W03.31.0013 от 20.02.2017 по теме «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве» в 2020 году.

**Ключевые слова:** молекулярно-генетические технологии, экспрессия генов, куры-несушки, иммунитет, лаборатория

Международная лаборатория молекулярной генетики и геномики птицы создана в 2017 году накафедре зоогигиены и птицеводства им. А. К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМиБ – MBA имени К. И. Скрябина с целью выполнения проекта по Договору № 14.W03.31.0013 от 20.02.2017 по теме «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве», успешно развивается и стала стартовой площадкой для молодых ученых и инновационных проектов в области современных биотехнологий в сельском хозяйстве и АПК.

Развитие современных высокопроизводительных молекулярно-генетических и геномных методов и технологий, используемых в сочетании с доступной геномной последовательностью домашней курицы (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004), дало мощный импульс для широкомасштабных исследований, проводимых на птицах, – как фундаментальных (Романов и др., 2020), так и, в первую очередь, прикладных.

На современном этапе развития промышленного яичного птицеводства одной из основных задач является снижение затрат на производство продукции и повышение ее качества. Для этого необходимо создать условия содержания и кормления птицы, обеспечивающие максимальную реализацию генетически обусловленных потенциальных возможностей организма.

Важнейшими экономическими показателями в птицеводстве являются яйценоскость и масса яйца кур-несушек. В настоящее время наиболее слабо изученным фактором, влияющим на продуктивность и устойчивость птицы к заболеваниям, является состояние микрофлоры кишечника и его изменения под влиянием различных кормовых добавок.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) сельскохозяйственной птицы, особенно резидентная и симбиотическая, влияет на здоровье птицы (в первую очередь, на иммунитет), на продуктивность и, соответственно, на срок продуктивного использования. Особенности микрофлоры кур влияют и на санитарно-гигиенические требования к продукции птицеводства (мясо, яйца). Например, многие возбудители пищевых токсоинфекций и токсикозов у людей, особенно кампилобактериозов, вызываются за счет контаминации мяса и яиц бактериями, являющимися нормальными обителями ЖКТ у кур.

В связи с этим актуальной является разработка новых молекулярно-генетических технологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью к негативным факторам, обеспечивающих сохранение здоровья птицы и повышение биобезопасности, продуктивности и качества продукции птицеводства (Нарушин В.Г. и др., 2019).

Система коррекции микрофлоры основана на применении безопасных для человека кормовых добавок (пробиотики, фитобиотики) и системы мониторинга микрофлоры с помощью молекулярно-генетических методов анализа, например, методики терминального полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (T-RFLP; Фисинин и др., 2015; Ilina et al., 2016).

В последние годы в МВА имени К.И. Скрябина разрабатываются современные биотехнологии для оценки экспрессии генов в связи с устойчивостью к болезням и продуктивностью у домашней птицы, а также системы мониторинга различных физиологических состояний животных и таких важных процессов, как переваривание и всасывание в ЖКТ биологически активных соединений поступающих с пищей, колостральный и постнатальный иммунитет и др. К числу наиболее перспективных и активно развиваемых направлений при этом относится оценка воздействия кормовых добавок на микрофлору кишечника и продуктивность птицы. В частности, несомненную важность имеет изучение сочетанного влияния кормовых добавок на эмбрионы и молодняк кур яичного и мясного направлений продуктивности (Кочиш И.И. и др., 2020а).

Вспышки болезней пищевого происхождения у людей нередко ассоциируются с бактерией *Salmonella enterica* серовар Enteritidis (SE) (Mughini-Grass et al., 2014). Сальмонеллез, вызываемый данным патогеном, является одной из наиболее распространённых инфекционных болезней в птицеводстве в Российской Федерации (Спиридонов и др., 2015). У сельскохозяйственных животных и птиц слизистая оболочка кишечника формирует наибольшую поверхность контакта с внешней средой и представляет собой основные ворота для проникновения SE(Galán, Curtiss, 1989).

Известно, что кишечные патогены при проникновении в организм хозяина способны модулировать его транскрипционную программу (Aldridge et al., 2005; Jenner, Young, 2005). Распознание патогена – это крайне сложный процесс, который вызывает изменения уровней экспрессии множества генов хозяина и находится в зависимости от значительного количества факторов: генотипа, иммунологического статуса хозяина, диетических факторов и т. д.

У кур первоначальное распознавание сальмонеллы в слепых отделах кишечника происходит при помощи рецепторов TLR, что сопровождается последующей индукцией генов, связанных с синтезом хемокинов, цитокинов и многих эффекторных генов, которые составляют основу системы врожденного иммунитета. Это приводит к инфильтрации гетерофилов, макрофагов и В- и Т-лимфоцитов (Barrow et al., 1987; Kogut et al., 1994).

Развитию воспалительной реакции у кур способствуют такие цитокины, как интерлейкин-1β (IL1B), интерлейкин-6 (IL6), интерлейкин-17 (IL17A), интерлейкин-22 (IL22) и др. Кроме того, в различных органах и тканях у кур, в том числе в эпителиальных клетках кишечника, отмечена экспрессия генов, связанных с синтезом β-дефензинов (*AvBD*), или галлинацинов (van Dijk et al., 2007), а также хемокинов – пептидов, основной функцией которых является регуляция движения лейкоцитов. В геноме курицы идентифицированы 24 гена, связанных с синтезом хемокинов, в том числе *IL8L1* (*CXCLi1*, *K60*), который участвует в передаче сигналов между иммунными клетками (Moser et al., 2004). По наблюдению van Hemert (2007), у бройлеров наиболее выраженные изменения в уровне экспрессии генов, связанных с иммунитетом, были отмечено через сутки после заражения сальмонеллой.

На фоне того, что заражение кур сальмонеллой, как правило, характеризуется индукцией воспалительного ответа и повышением экспрессии множества генов, отмечено, что уровень экспрессии иных генов может быть уменьшен вследствие инфицирования данным патогеном (Coble et al., 2013). Как было отмечено (Coble et al., 2013), заражение кур 5-месячного возраста SE приводило к снижению уровня экспрессии 32 различных генов в слепых отделах кишечника и печени через 10 дней после инфицирования. Данные гены преимущественно принадлежали в двум функциональным категориям: контролирующие метаболические функции и клеточный цикл. Наибольшее угнетение экспрессии отмечалось для генов, связанных с синтезом аквапорина-8 (*AQP8*), кальбиндина-1 (*CALB1*), белка FABP1, связывающего жирные кислоты (*FABP1*).

Важно, что эпителиальная оболочка, защищая хозяина от патогенов, присутствующих в просвете кишечника, выполняет задачу по поглощению питательных веществ через многочисленные ионные каналы и транспортеры, присутствующие на апикальной кишечной эпителиальной границе. Известно, что микробные инфекции способны оказывать влияние на транспорт ионов в кишечнике птицы, что зависит от таких факторов, как иммунитет хозяина, вирулентность патогенных микроорганизмов и структурная организация слизистой оболочки конкретного сегмента кишечника, возраст животного (Norkina et al., 2004; Withanage et al., 2005; Larmonier et al., 2013). Исследования разных авторов (Chang et al., 1990; Norkina et al., 2004; Larmonier et al., 2013) показали, что нарушение функционирования переносчиков ионов, таких как CFTR и NHE, в результате заражения кур патогенами может проявляться в виде диареи, мальабсорбции и воспаления кишечника, что приводит к низкой эффективности производства (Berkes et al., 2003).

Помимо использования антибиотиков, важным способом профилактики бактериальных заболеваний является модуляция кишечной защиты с помощью использования пребиотиков, пробиотиков, фитобиотиков и других кормовых ингредиентов (Van den Broeck et al., 1999; Baylis, Goldmann, 2004).

Несмотря на имеющиеся в литературе данные, лучшее представление о функционировании генов, связанных с иммунитетом и метаболизмом у кур, может помочь в понимании механизмов адаптивного ответа на заражение сальмонеллой и разработке научных стратегий, направленных на максимальное улучшение состояния их здоровья и, в конечном итоге, продуктивности.

Исходя из основных результатов, достигнутых в ходе осуществленных в 2020 году исследований четвертого этапа проекта по Договору № 14.W03.31.0013 от 20.02.2017 г. по теме «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве», отобран перечень генов, участвующих в формировании признаков продуктивности у кур-несушек в промышленных условиях и произведена оценка степени экспрессии отобранных генов при тестировании действия пребиотической добавки на генную экспрессию у промышленных кур-несушек, разработаны Методические рекомендации по использованию кормовой добавки, прошедшей испытания в промышленных условиях на высокопродуктивных промышленных курах-несушках (Кочиш И.И. и др., 2020).

По итогам выполненных исследований можно заключить, что оптимизация микробиоты кишечника в условиях промышленного птицеводства является важнейшим направлением исследований в области кормления и физиологии сельскохозяйственных птиц, а роль кормовых добавок, способствующих поддержанию оптимальной микробиоты кишечника, трудно переоценить.

***Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).***

**Список литературы**

1. Кочиш И.И., Мясникова О.В., Мартынов В.В., Смоленский В.И. Микрофлора кишечника кур и экспрессия связанных с иммунитетом генов под влиянием пробиотической и пребиотической кормовых добавок // Сельскохозяйственная биология. 2020а. Т. 55. № 2. С. 315–327.
2. Кочиш И.И., Мясникова О.В., Мартынов В.В., Бойко Е.Е., Коренюга М.В. Полиморфизм однонуклеотидных замен в генах миостатина и пролактина у кур исходных линий кросса «Смена-8» // Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных: Материалы 2-й Международной конференции. М.: Сельскохозяйственные технологии, 2020. С. 45–58.

# Нарушин В.Г., Селина М.В., Романов М.Н. Анализ сопряженных изменений экспрессии генов и биохимических показателей крови в эксперименте на курах-несушках // Материалы Международной конференции «Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных». М.: Сельскохозяйственные технологии, 2019. С. 67–82.

1. Романов М.Н., Киазим Л., О'Коннор Р., Гриффин Д.К. Современные молекулярно-генетические и геномные технологии в области изучения биологии птиц. 2. Фундаментальные исследования // Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных: Материалы 2-й Международной конференции. М.: Сельскохозяйственные технологии, 2020. С. 34–44. - 2
2. Спиридонов А.Н., Петрова О.Н., Ирза В.Н., Караулов А.К., Никифоров В.В. Об эпизоотической ситуации по инфекционным болезням птиц на основе анализа данных ветеринарной отчетности // Ветеринария сегодня. 2015. № 4. С. 18–28.
3. Фисинин В.И., Егоров И.А., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Новикова Н.И. Выявление микроорганизмов в куриных эмбрионах методом T-RFLP // Птица и птицепродукты. 2015. № 6. С. 24–26.
4. Baylis M, Goldmann W. The genetics of scrapie in sheep and goats. Curr Mol Med. 2004;4(4):385–396.
5. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. Gut. 2003;52(3):439–451.
6. Chang EB, Musch MW, Mayer L. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. Gastroenterology. 1990;98(6):1518–1524.
7. Coble D.J., Sandford E.E., Ji T., Abernathy J., Fleming D., Zhao H., Lamont S.J. Impacts of Salmonella enteritidis infection on liver transcriptome in broilers // Genesis. 2013. Vol. 51. P. 357–364.
8. Galán JE, Curtiss R 3rd. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:6383–6387.
9. International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature. 2004;432:695–716. - 1
10. Kogut M.H., Tellez G.I., McGruder E.D., Hargis B.M., Williams J.D., Corrier D.E., DeLoach J.R. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to Salmonella enteritidis infections // Microb. Pathog. 1994. Vol. 16. P. 141–151.
11. Larmonier C.B., Laubitz D., Hill F.M., Shehab K.W., Lipinski L., Midura-Kiela M.T., McFadden R.M., Ramalingam R., Hassan K.A., Golebiewski M., Besselsen D.G., Ghishan F.K., Kiela P.R. Reduced colonic microbial diversity is associated with colitis in NHE3-deficient mice // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2013. Vol. 305. P. G667–G677.
12. Mughini-Gras L., Enserink R., Friesema I., Heck M., van Duynhoven Y., van Pelt W. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis // PLoS One. 2014. Vol. 9. No. 9. Art. e87933.
13. Norkina O., Burnett T.G., De Lisle R.C. Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine // Infect Immun. 2004. Vol. 72. P. 6040–6049.
14. Van den Broeck W, Cox E, Goddeeris BM. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. Infect Immun. 1999;67(2):520–526.
15. Withanage GS, Wigley P, Kaiser P, Mastroeni P, Brooks H, Powers C, Beal R, Barrow P, Maskell D, McConnell I. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. Infect Immun. 2005;73(8):5173–5182.