



# Kent Academic Repository

Romanov, Michael N., Laptev, Georgi Yu., Yildirim, Elena A., Ilna, Larisa A., Filippova, Valentina A., Kochish, Ivan I., Dubrovin, Andrei V., Novikova, Natalia I., Dnyashev, Timur P., Smolensky, Vladimir I. and others (2020) [*Current molecular genetic and genomic technologies in the field of studying the avian biology. 1. Applied research*] *Современные молекулярно-генетические и геномные технологии в области изучения биологии птиц. 1. Прикладные исследования.*

In: Materials of the 2nd International Scientific and Practical Conference / **Материалы 2-й Международной научно-практической конференции.** .

Downloaded from <https://kar.kent.ac.uk/89219/> The University of Kent's Academic Repository KAR  
pp. 13-33. **Сельскохозяйственные технологии / Сельскохозяйственные технологии, Moscow, Russia / Москва, Россия**

The version of record is available from

<https://doi.org/10.18720/SPBPU/2/k20-5>

## This document version

Publisher pdf

## DOI for this version

## Licence for this version

UNSPECIFIED

## Additional information

In Russian; English abstract

## Versions of research works

### Versions of Record

If this version is the version of record, it is the same as the published version available on the publisher's web site. Cite as the published version.

### Author Accepted Manuscripts

If this document is identified as the Author Accepted Manuscript it is the version after peer review but before type setting, copy editing or publisher branding. Cite as Surname, Initial. (Year) 'Title of article'. To be published in **Title of Journal** , Volume and issue numbers [peer-reviewed accepted version]. Available at: DOI or URL (Accessed: date).

## Enquiries

If you have questions about this document contact [ResearchSupport@kent.ac.uk](mailto:ResearchSupport@kent.ac.uk). Please include the URL of the record in KAR. If you believe that your, or a third party's rights have been compromised through this document please see our [Take Down policy](https://www.kent.ac.uk/guides/kar-the-kent-academic-repository#policies) (available from <https://www.kent.ac.uk/guides/kar-the-kent-academic-repository#policies>).

**СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
В ОБЛАСТИ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИИ ПТИЦ.  
1. ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Романов М.Н.,<sup>1,2</sup> Лаптев Г.Ю.,<sup>3</sup> Йылдырым Е.А.,<sup>3</sup>  
Ильина Л.А.,<sup>3</sup> Филиппова В.А.,<sup>3</sup> Кочиш И.И.,<sup>1</sup>  
Дубровин А.В.,<sup>3</sup> Новикова Н.И.,<sup>3</sup> Дуняшев Т.П.,<sup>3</sup>  
Смоленский В.И.,<sup>1</sup> Никонов И.Н.,<sup>1</sup>  
Селина М.В.,<sup>1</sup> Сурай П.Ф.<sup>1,4,5,6</sup>**

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

<sup>2</sup> Университет Кента, Кентербери, Великобритания;

<sup>3</sup> ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup> Университет Святого Иштвана, Гёделлё, Венгрия;

<sup>5</sup> Тракийский Университет, Стара Загора, Болгария;

<sup>6</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия.

E-mail: m.romanov@kent.ac.uk

**Аннотация**

Современные высокопроизводительные молекулярно-генетические и геномные технологии находят в настоящее время самое широкое применение в прикладных исследованиях на сельскохозяйственной птице. В предлагаемой молекулярно-генетической работе были изучены эффекты заражения кур-несушек сальмонеллой и добавления в корм фитобиотика Интебио на основе эфирных масел. Показано как угнетающее, так и активирующее влияние этих факторов на уровень экспрессии ряда генов, связанных с иммунитетом, транспортом молекул и ионов в кишечнике и

продуктивностью как через сутки, так и через 7 суток после заражения. Кормовая добавка может содействовать формированию мобилизующего статуса напряженности иммунной системы за счет активации ключевых генов.

Ключевые слова: молекулярно-генетические технологии, экспрессия генов, RT-PCR, кишечник, куры-несушки, фитобиотик, иммунитет

## **Введение**

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, в первую очередь, прикладных исследований, проводимых на птицах.

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 токсинфекций и токсикозов у людей, особенно кампилобактериозов, вызываются за счет контаминации мяса и яиц бактериями, являющимися нормальными обитателями ЖКТ у кур.

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

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; Pina 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 до-

бавок на эмбрионы и молодняк кур яичного и мясного направления продуктивности.

Вспышки болезней пищевого происхождения у людей нередко ассоциируется с *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). Распознавание 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-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), 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  $\beta$ -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*), участвующий в передаче сигналов между иммунными клетками (Moser et al., 2005). 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 ор-

ганизация слизистой оболочки конкретного сегмента кишечника, возраст животного (Norkina et al., 2004; Withanage et al., 2005; Larmonier et al., 2013). Исследования (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. В связи с этим целью настоящих прикладных исследований стало изучение эффектов заражения SE и введения в рацион фитобиотика на основе эфирных масел на экспрессию генов, связанных с иммунитетом и продуктивностью несушек.

## **Материалы и методы**

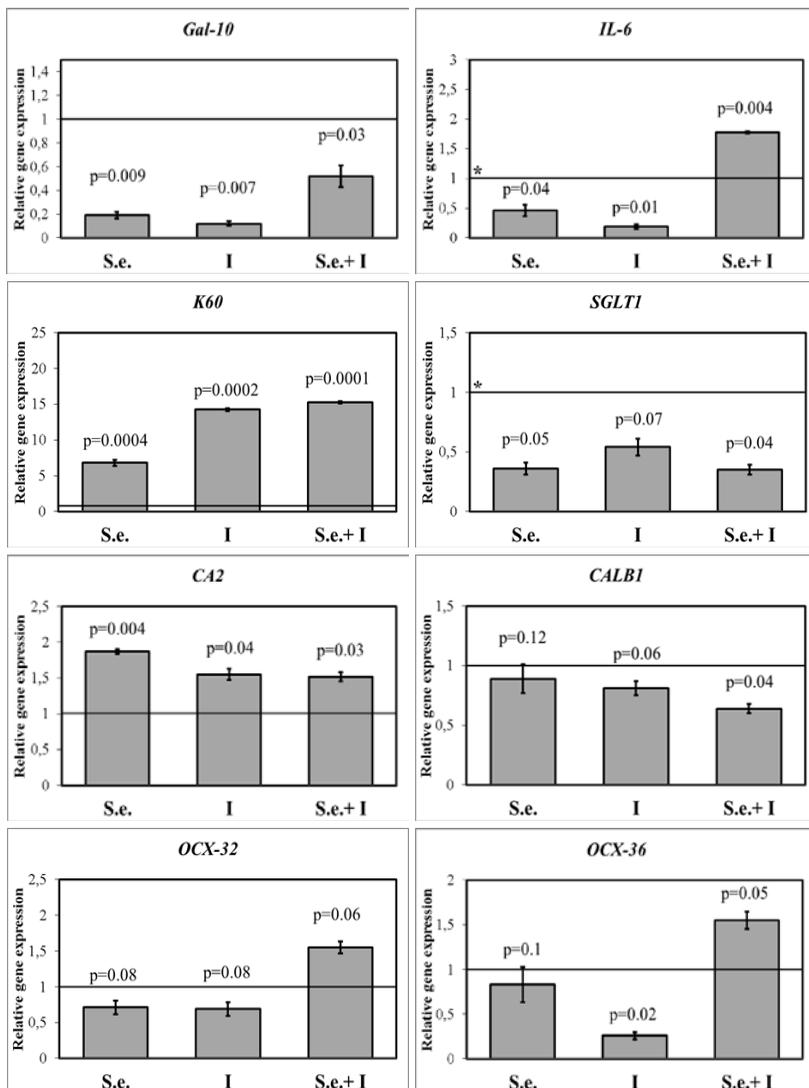
Эксперимент проводили на курах-несушках промышленного кросса «Ломанн Белый». Начало учетного периода опыта соответствовало 346 суткам жизни птиц. Птиц случайным образом распределяли на 2 аналогичные группы по 40 голов в каждой группе. Одна группа до конца эксперимента получала фитобиотик Интебио (ООО «БИО-

ТРОФ», г. Санкт-Петербург) с кормом в количестве 90 г/т комбикорма. Каждая из групп в возрасте 367 суток была разделена случайным образом на две равные части и подвержена заражению эпизоотическим штаммом SE, в результате чего были сформированы четыре группы: 1) контрольная, 2) контрольная с заражением SE, 3) Интебио и 4) Интебио с заражением SE.

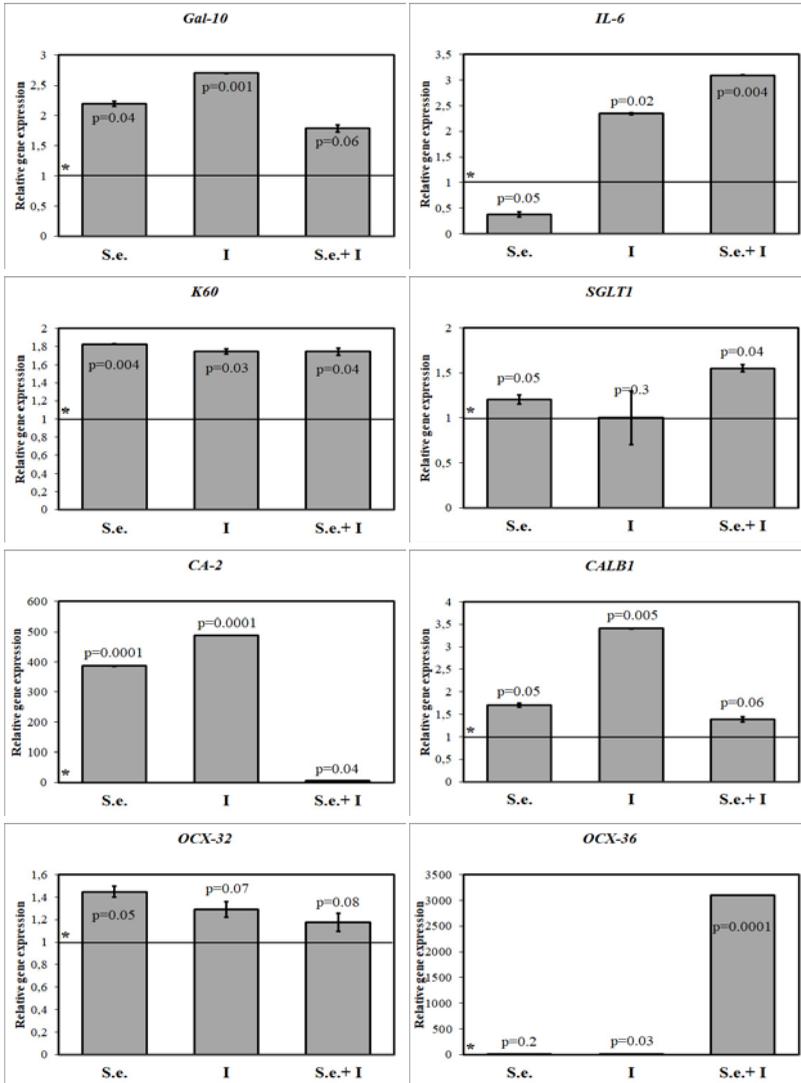
Для оценки экспрессии генов с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) отбирали ткани слепых отростков кишечника, для анализа микробиома — содержимого слепых отростков кишечника. Исследование реакции экспрессии генов в ответ на заражение сальмонеллой было исследовано через сутки после заражения несушек, а также через 7 суток после инфицирования с целью наблюдения за отдаленными последствиями заражения. При этом были выбраны некоторые ключевые гены, связанные с иммунитетом, транспортом ионов в кишечнике и продуктивностью.

### **Результаты и обсуждение**

По результатам исследования было показано, что через сутки после заражения SE было отмечено снижение уровня экспрессии гена *AvBD10* (*Gal-10*), который связан с синтезом  $\beta$ -дефензина-10, принимающего участие в воспалительном иммунном ответе, во всех опытных вариантах по сравнению с контролем (рис. 1; до 1,92 раз). Сходные результаты были получены в работе Ramasamy et al. (2011), в которой авторы наблюдали снижение уровня экспрессии гена *AvBD10* в опыте по заражению цыплят *S. enterica* серовар Pullorum. При этом уменьшение уровня экспрессии *AvBD10* в слепых отростках кишечника при заражении сальмонеллой достигало 2,04 раза (при  $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем без инфицирования. Ранее другими исследователями при заражении птиц сальмонеллой был так-



**Рис. 1. Экспрессия генов, связанных с продуктивностью и иммунитетом кур-несушек, через сутки после заражения сальмонеллой в опытных группах: S.e. — *Salmonella* Enteritidis; I — Интебио; S.e. + I — *S. Enteritidis* + Интебио**



**Рис. 2. Экспрессия генов, связанных с продуктивностью и иммунитетом кур-несушек, через 7 суток после заражения сальмонеллой в опытных группах: S.e. — *Salmonella* Enteritidis; I — Интебио; S.e. + I — *S. Enteritidis* + Интебио**

же зафиксирован более низкий уровень экспрессии генов дефензинов у чувствительных к инфицированию сальмонеллой кур по сравнению с устойчивыми (Sadeyen et al., 2004). Это исследование продемонстрировало различия в выраженности экспрессии генов, связанных с иммунитетом, между восприимчивыми и устойчивыми куриными линиями.

Через 7 суток после заражения сальмонеллой, напротив, наблюдалось усиление уровня экспрессии гена *AvBD10* во всех опытных вариантах по сравнению с контролем без заражения (рис. 2). Вероятно, данный ген принимал участие в обеспечении резистентности к сальмонелле у исследованных кур, как это показано другими авторами (Hasenstein, Lamont, 2007; Mukhopadhyay et al., 2010), однако активация его происходила позднее, чем через сутки после заражения сальмонеллой.

Интересно, что через сутки после заражения введение в рацион фитобиотика Интебио также способствовало снижению уровня экспрессии гена *AvBD10* в 8,3 раза (при  $P=0,007$ ) по сравнению с контролем без заражения. По-видимому, данное явление носило позитивный характер. Дело в том, что при избыточной активации иммунной системы происходит быстрое увеличение количества иммунных клеток, что вызывает существенное увеличение расхода питательных веществ, ослабление организма и снижение продуктивности. Противовоспалительное действие эфирных масел было отмечено ранее другими исследователями (Yang et al., 2015; Крюков, Глебова, 2017).

Однако через неделю после заражения, напротив, наблюдалось наибольшее усиление экспрессии гена *AvBD10* в варианте с введением Интебио без заражения (при  $P=0,001$ ) по сравнению с контролем и вариантами с инфицированием, что указывает на активирующее влияние фитобиотика на экспрессию данного гена. Интересно, что че-

рез сутки и через 7 суток после заражения SE было отмечено увеличение уровня экспрессии гена *IL6* в вариантах с введением Интебио и инфицированием сальмонеллой по сравнению с другими вариантами (рис. 2). При этом в варианте с заражением сальмонеллой без введения в рацион фитобиотика наблюдалось снижение уровня экспрессии *IL6* через сутки в 2,2 раза ( $P=0,04$ ) и через 7 суток в 2,7 раза ( $P=0,05$ ) по сравнению с контролем без инфицирования. Вероятно, данный ген в настоящем эксперименте не принимал участие в обеспечении резистентности к сальмонелле у исследованных кур, тогда как применение препарата Интебио могло положительно сказаться на увеличении уровня резистентности к сальмонелле.

Тем не менее в других работах (Berndt et al., 2007, Srhanova et al., 2011) сообщалось об увеличении количества цитокинов и иммунных белков, таких как  $IL1\beta$ ,  $IL6$ ,  $IL8$ ,  $IL12$ ,  $IL17$ ,  $IL18$ ,  $IL22$ ,  $IL23$ ,  $IFN\gamma$  и  $LITAF$ , после заражения кур сальмонеллой, что вступает в некоторое противоречие с результатами описываемых здесь исследований.

В тоже время через сутки после заражения SE (рис. 1) было отмечено резкое увеличение (до 15,3 раз при  $P=0,0001$ ) уровня экспрессии гена *IL8L1* во всех опытных вариантах по сравнению с контролем. Интересно, что введение в рацион фитобиотика Интебио в группе без заражения также способствовало резкому увеличению уровня экспрессии гена *IL8L1* (при  $P=0,0002$ ) по сравнению с контролем без заражения, что может свидетельствовать о позитивной роли фитобиотика в усилении защитных барьеров организма птицы. Ранее Setta et al. (2012) при инфицировании SE бройлеров кросса Росс 308 наблюдали значительное увеличение уровня экспрессии хемокинов *IL8L1* и *IL8L2* (*CXCLi2*) в миндалинах слепой кишки по сравнению с вариантом без заражения, а также с инфицированием другими серотипами сальмонеллы, протестиро-

ванными в этом исследовании. Повышение уровня экспрессии гена *IL8L1* достигало 3,13 раза (при  $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем без заражения. Кроме того, van Nempt (2007) в ответ на заражение SE наблюдал усиление экспрессии генов, связанных с синтезом СХС хемокинов, в том числе *IL8L1*, в тонком кишечнике кур двух линий (быстро растущей линии А и медленно растущей линии В).

Примечательно, что через 7 суток после заражения SE (рис. 2) увеличение уровня экспрессии гена *IL8L1* во всех вариантах было не таким выраженным, как через сутки после заражения, и не превышало по сравнению с контролем 1,82 раза ( $P = 0,004$ ).

Таким образом, анализируя действие фитобиотика на активацию генов иммунитета, можно заключить, что через сутки после инфицирования адаптивный ответ на заражение сальмонеллой на фоне применения Интебио заключался в усилении уровня экспрессии таких генов, как *AvBD10*, *IL6* и *IL8L1*, по сравнению с группой с инфицированием без введения фитобиотика.

Через сутки после заражения SE (рис. 1) было отмечено снижение уровня экспрессии гена *SLC5A1* (*SGLT1*) в вариантах с заражением сальмонеллой по сравнению с контролем без заражения. Уровень снижения экспрессии в варианте с заражением сальмонеллой был снижен в 2,8 раза ( $P = 0,05$ ), а с инфицированием сальмонеллой и одновременным введением Интебио — в 2,9 раз ( $P = 0,04$ ). *SLC5A1* представляет собой мембранный белок, натрий-зависимый глюкозный котранспортер, который входит в семейство переносчиков глюкозы и является высокоаффинным котранспортером  $\text{Na}^+$ /глюкозы (Lehmann, Hornby, 2016). Известно, что транспорт глюкозы и галактозы через энтероциты кишечника, обеспечивает эффективный ионный гомеостаз и является первым шагом в поглощении углеводов и кормов (Wright, Turk, 2004; Wright et al., 2004). Веро-

ятно, кишечная инфекция, вызванная сальмонеллой, являясь результатом взаимодействия между различными факторами вирулентности патогена и защитными механизмами хозяина, может приводить к изменению процессов транспорта питательных веществ в кишечнике. Подобные исследования ранее было проведено на мышах с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Bertelsen et al., 2003). Было показано, что инфицирование *S. enterica* серовар Турхимурium способствовало, напротив, быстрому увеличению транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и цАМФ.

Через 7 суток после заражения SE (рис. 2) наблюдалось восстановление уровня экспрессии гена *SLC5A1* и даже некоторое его усиление в обоих вариантах с заражением сальмонеллой.

Через сутки после заражения SE (рис. 1) было отмечено некоторое увеличение уровня экспрессии гена *CA2* (*Ca2*) во всех опытных вариантах по сравнению с контролем без заражения. Данный ген связан с синтезом фермента карбоангидразы II, участвующего в образовании  $\text{CaCO}_3$ , и, как следствие, оказывает влияние на кальцификацию яичной скорлупы (Gutowska, Mitchell, 1945). Через 7 суток после заражения происходила резкая активация экспрессии гена *CA2* в варианте с заражением сальмонеллой в 388 раз ( $P=0,0001$ ) по сравнению с контролем, а также в варианте с применением Интебио без заражения — в 488,9 раз ( $P=0,0001$ ) по сравнению с контролем.

В литературе отсутствуют данные об изменении уровня экспрессии гена *CA2* в ответ на заражение SE. Однако существуют данные об активации гена *CA2* в ответ на скормливание цыплятам-бройлерам карбаматного пестицида тирам, вызывающего у цыплят дисхондроплазию большеберцовой кости (Tian et al., 2009).

Интересно возрастание уровня экспрессии гена *CALB1* в 3,4 раза (при  $P=0,005$ ) у кур из группы без заражения с

применением Интебио по сравнению с контролем без заражения. Это может свидетельствовать о позитивной роли введения в рацион несущек Интебио, поскольку данный ген связан с синтезом кальбиндина — белка, участвующего в транспорте кальция. Показана связь данного гена с механическими свойствами яичной скорлупы (Sun et al., 2016). Кроме того продемонстрировано (Sun et al., 2016), что у кур, несущих яйца с прочной скорлупой, уровень экспрессии *CALBI* в яйцеводах был в 3 раза выше (при  $P < 0,05$ ), чем у кур, от которых получали яйца с непрочной скорлупой.

В исследовании отмечена активация экспрессии гена *RARRES1* (*OCX-32*) в ответ на заражение сальмонеллой по сравнению с контролем без заражения через 7 суток после инфицирования. Ген *RARRES1* связан с синтезом овокаликсина-32 — белка массой 32 кДа, входящего в состав матрикса яичной скорлупы. Известно, что яичная скорлупа птиц, являясь высокоупорядоченным биоминералом, состоящим из карбоната кальция, связанного с органическим матриксом, обеспечивает развивающемуся эмбриону защиту от колонизации патогенной микрофлорой (Gautron, Nys, 2007). В исследованиях (Gautron, Nys, 2007) было проведено изучение функций рекомбинантного белка *OCX-32*. Белок был извлечен из клеток *Escherichia coli* и очищен с помощью аффинной хроматографии. Было показано, что *OCX-32* оказывал ингибирующее воздействие на рост *Bacillus subtilis* (Xing et al., 2007). По результатам настоящих исследований можно заключить, что отдаленным последствием заражения несущек патогенами может являться активация генов, связанных с увеличением защитных свойств яичной скорлупы.

Интересные данные были получены в результате изучения экспрессии гена *BPIFB3* (*OCX-36*), связанного с синтезом овокаликсина-36 — белка яичной скорлупы массой

36 кДа. Овокаликсин-36 секретируется в яйцеводах, его экспрессия, как правило, регулируется во время активной фазы кальцификации скорлупы (Gautron et al., 2007; Dunn et al., 2009). Экспрессия гена *BPIFB3* отмечена также в тканях кишечника (Chiang et al., 2011). В настоящем эксперименте было отмечено существенное увеличение уровня экспрессии гена *BPIFB3* в вариантах с применением Интебио без заражения и применения Интебио с заражением через 7 суток после инфицирования. Эти данные представляют большую ценность, поскольку известно (Dunn et al., 2009), что функционирование гена *BPIFB3* было связано с толщиной мамиллярного слоя скорлупы. Yang et al. (2007) продемонстрировали, что ген *BPIFB3* является потенциальным молекулярным маркером, связанным с различными темпами производства яиц. Данные результаты демонстрируют влияние гена *BPIFB3* на продуктивность несушек. Кроме того, известно, что овокаликсин-36 обладает антимикробной активностью и участвует в естественной защите эмбриона (Gautron et al., 2007).

Мы не встретили в литературе данных об изменении уровня экспрессии гена *BPIFB3* в ответ на заражение SE, что свидетельствует о существенной научной новизне полученных результатов.

### **Заключение**

Таким образом, в прикладном молекулярно-генетическом исследовании было показано, что заражение кур-несушек SE и введение в рацион фитобиотика Интебио на основе эфирных масел оказывали как угнетающее, так и активирующее воздействие на уровень экспрессии некоторых генов, связанных с иммунитетом, транспортом молекул и ионов в кишечнике и продуктивностью. Изменения в уровне экспрессии данных генов наблюдались как через сутки, так и через 7 суток после заражения сальмонеллой.

Судя по комплексной оценке данных, добавка создает определенный мобилизующий статус напряженности иммунной системы за счет активации ряда ответственных генов еще до инфицирования, и, как следствие, это находит отражение в поддержании яичной продуктивности на уровне здоровой птицы.

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

### Список литературы

Крюков В.С., Глебова И.В. Антибактериальное действие эфирных масел лекарственных растений (обзор). Проблемы биологии продуктивных животных. 2017. № 3. С. 5–25.

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.

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.

Aldridge PD, Gray MA, Hirst BH, Khan CM. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. Mol Microbiol. 2005; 55(3):655–663.

Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA, Simpson JM. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. Res Vet Sci. 1987; 42(2):194–199.

Baylis M, Goldmann W. The genetics of scrapie in sheep and goats. Curr Mol Med. 2004; 4(4):385–396.

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.

Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of

different levels of invasiveness. *Infect Immun.* 2007; 75(12):5993–6007.

Bertelsen LS, Paesold G, Eckmann L, Barrett KE. *Salmonella* infection induces a hypersecretory phenotype in human intestinal xenografts by inducing cyclooxygenase 2. *Infect Immun.* 2003; 71(4):2102–2109.

Chang EB, Musch MW, Mayer L. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. *Gastroenterology.* 1990; 98(6):1518–1524.

Chiang SC, Veldhuizen EJ, Barnes FA, Craven CJ, Haagsman HP, Bingle CD. Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene. *Dev Comp Immunol.* 2011; 35(3):285–295.

Coble DJ, Sandford EE, Ji T, Abernathy J, Fleming D, Zhao H, Lamont SJ. Impacts of *Salmonella enteritidis* infection on liver transcriptome in broilers. *Genesis.* 2013; 51(5):357–364.

Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. *Infect Immun.* 2011; 79(7):2755–2763.

Dunn IC, Joseph NT, Bain M, Edmond A, Wilson PW, Milona P, Nys Y, Gautron J, Schmutz M, Preisinger R, Waddington D. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. *Anim Genet.* 2009; 40:110–114.

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.

Gautron J, Nys Y. Function of eggshell matrix proteins. In: R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Anton and R. Schade (eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Berlin: Springer-Verlag, 2007, Ch. 17, pp. 109–115.

Gautron J, Murayama E, Vignal A, Morisson M, McKee MD, Réhault S, Labas V, Belghazi M, Vidal ML, Nys Y, Hincke MT. Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-

increasing proteins, and plunc family proteins. *J Biol Chem.* 2007; 282:5273–5286.

Gutowaska MS, Mitchell CA. Carbonic anhydrase in the calcification of the egg shell. *Poult Sci.* 1945; 24:159–167.

Ilina LA, Yildirim EA, Nikonov IN, Filippova VA, Laptev GY, Novikova NI, Grozina AA, Lenkova TN, Manukyan VA, Egorov IA, Fisinin VI. Metagenomic bacterial community profiles of chicken embryo gastrointestinal tract by using T-RFLP analysis. *Dokl Biochem Biophys.* 2016; 466:47–51.

International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature.* 2004; 432:695–716.

Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:281–294.

Kogut MH, Tellez GI, McGruder ED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE, DeLoach JR. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microb Pathog.* 1994; 16:141–151.

Larmonier CB, Laubitz D, Hill FM, Shehab KW, Lipinski L, Midura-Kiela MT, McFadden RM, Ramalingam R, Hassan KA, Golebiewski M, Besselsen DG, Ghishan FK, Kiela PR. Reduced colonic microbial diversity is associated with colitis in NHE3-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013; 305:G667–G677.

Lehmann A, Hornby PJ. Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016; 310:G887–G898.

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004; 25:75–84.

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; 9(2):e87933.

Mukhopadhyay CS, Kumar R, Brah GS. Gallinacin and fowlicidin: two promising antimicrobial peptides in chickens — a review. *Vet World*. 2010; 3(6): 297–300.

Norkina O, Burnett TG, De Lisle RC. Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect Immun*. 2004; 72(10):6040–6049.

Ramasamy KT, Verma P, Reddy MR. Differential gene expression of antimicrobial peptides  $\beta$  defensins in the gastrointestinal tract of *Salmonella* serovar Pullorum infected broiler chickens. *Vet Res Commun*. 2012; 36(1):57–62.

Sadeyen JR, Trotureau J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow PA, Bumstead N, Lalmanach AC. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes Infect*. 2004; 6(14):1278–1286.

Setta AM, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012; 35(5):397–410.

Sun C, Duan Z, Qu L, Zheng J, Yang N, Xu G. Expression analysis for candidate genes associated with eggshell mechanical property. *J Integr Agric* 2016; 15(2):397–402.

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.

van Dijk A, Veldhuizen EJ, Kalkhove SI, Tjeerdsma-van Bokhoven JL, Romijn RA, Haagsman HP. The beta-defensin gallinacin-6 is expressed in the chicken digestive tract and has antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(3):912–922.

van Hemert S. Gene expression profiling of chicken intestinal host. PhD thesis. Wageningen: Wageningen University, 2007. 159 p.

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.

Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5):510–518.

Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, Turk E. Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda).* 2004; 19:370–376.

Xing J, Wellman-Labadie O, Gautron J, Hincke MT. Recombinant eggshell ovocalyxin-32: expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2007; 147(2):172–177.

Yang C, Chowdhury MA, Huo Y, Gong J. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. *Pathogens.* 2015 Mar 23; 4(1):137–156.

Yang KT, Lin CY, Liou JS, Fan YH, Chiou SH, Huang CW, Wu CP, Lin EC, Chen CF, Lee YP, Lee WC, Ding ST, Cheng WT, Huang MC. Differentially expressed transcripts in shell glands from low and high egg production strains of chickens using cDNA microarrays. *Anim Reprod Sci.* 2007; 101(1–2):113–124.

## **Current molecular genetic and genomic technologies in the field of studying the avian biology.**

### **1. Applied research**

*Romanov M.N.,<sup>1,2</sup> Laptev G.Yu.,<sup>3</sup> Yildirim E.A.,<sup>3</sup> Ilina L.A.,<sup>3</sup>  
Filippova V.A.,<sup>3</sup> Kochish I.I.,<sup>1</sup> Dubrovin A.V.,<sup>3</sup>  
Novikova N.I.,<sup>3</sup> Dunyashev T.P.,<sup>3</sup> Smolensky V.I.,<sup>1</sup>  
Nikonov I.N.,<sup>1</sup> Selina M.V.,<sup>1</sup> Surai P.F.<sup>1, 4, 5, 6</sup>*

<sup>1</sup> K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> University of Kent, Canterbury, UK;

<sup>3</sup> OOO BIOTROF+, St Petersburg, Russia;

<sup>4</sup> Szent Istvan University, Gödöllo, Hungary;

<sup>5</sup> Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria;

<sup>6</sup> St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

## **Abstract**

Modern high-performance molecular genetic and genomic technologies are currently widely used in applied research on poultry. In the present molecular genetic study, the effects of infection of laying hens with *Salmonella* and the feed additive Intebio, an phytobiotic based on essential oils, were studied. Both the inhibitory and the activating influence of these factors on the level of expression of a number of genes associated with immunity, transport of molecules and ions in the intestine, and productivity were shown both in 1 day and 7 days post infection. The feed additive can promote the formation of the mobilizing status of the immune system tension by activating key genes.

**Key words:** molecular genetic technologies, gene expression, RT-PCR, intestines, laying hens, phytobiotic, immunity