

УДК: 636.5 636.085.16

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.312

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КРУПКИ ИЗ ЛАМИНАРИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОДУКТИВНОСТИ В ОРГАНИЗМЕ КУР-НЕСУШЕК

Кочиш И.И.¹ – д-р с.-х. наук, проф., академик РАН, зав. каф. зоогигиены и птицеводства имени А.К. Даниловой (ORCID 0000-0002-8502-6052); **Зимин Е.Е.**¹ – асп. (ORCID 0009-0007-9244-7334); **Никонов И.Н.**^{2*} – канд. биол. наук, ст. преподаватель (ORCID 0000-0001-9495-0178)

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

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

* ilnikonov@yandex.ru

Ключевые слова: ламинария, куры-несушки, продуктивность, экспрессия генов

Keywords: laminaria, laying hens, productivity, gene expression

Финансирование: Исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина за счет гранта Российского научного фонда № 22-16-00009, <https://rscf.ru/project/22-16-00009/>.

Поступила: 25.10.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

В рационах питания животных, в связи с отказом от антибиотиков и стимуляторов роста, необходимы альтернативные и безопасные добавки для улучшения их здоровья и благополучия. В связи с этим, актуальное значение приобретают биологически активные компоненты растительного происхождения, такие как экстракты и вытяжки из трав и древесины, сухая биомасса растений, в т.ч. водорослей. По мнению многих авторов, морские водоросли могут применяться в птицеводстве в составе компонентов комбикормов и кормовых добавок как для улучшения иммунного статуса, так и для нормализации микрофлоры в пищеварительном тракте. Рекомендуемые дозировки водорослей, применяемые для улучшения качества получаемой продукции, составляют от 1% до 5% на сухой вес. Цель представленного исследования заключалась в изучении действия крупки из ламинарии на экспрессию генов организма кур-несушек кросса «Ломанн Белый». В работе использовались зоотехнические методы и методы молекулярной биологии. В ходе проведенного исследования было оценено действие крупки из ламинарии на экспрессию генов продуктивности кур-несушек. Ввод ламинарии 5 г/кг в рацион кур-несушек старшего возраста, способствовал положительной активации генов продуктивности (OSX-32, OSX-36, CALB1) на 30-60%. Полученные результаты являются основой для разработки новых биотехнологий, способствующих продлению срока

продуктивного использования кур-несушек промышленных кроссов благодаря улучшению показателей яйценоскости. С целью повышения показателей яичной продуктивности, а также увеличения экспрессии генов продуктивности и резистентности яичных кур, рекомендуем включать в рационы кур-несушек биологически активную добавку из ламинарии из расчета 5 г/кг корма.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В рационах питания животных, в связи с отказом от антибиотиков и стимуляторов роста, необходимы альтернативные и безопасные добавки для улучшения их здоровья и благополучия. В связи с этим, актуальное значение приобретают биологически активные компоненты растительного происхождения, такие как экстракты и вытяжки из трав и древесины, сухая биомасса растений, в т.ч. водорослей. По мнению многих авторов, морские водоросли могут применяться в птицеводстве в составе компонентов комбикормов и кормовых добавок как для улучшения иммунного статуса, так и для нормализации микрофлоры в пищеварительном тракте. Рекомендуемые дозировки водорослей, применяемые для улучшения качества получаемой продукции, составляют от 1% до 5% на сухой вес [1, 4, 5, 8].

Наумова Л.И. [9, 10] в опытах по кормлению на курах-несушках установила положительное влияние добавки из муки бурых водорослей *Laminaria* 2,5% в составе комбикорма на зоотехнические показатели (яйценоскость, интенсивность яйцекладки). В опытной группе интенсивность яйцекладки увеличилась на 4,8%. По данным автора, соотношение полиненасыщенных жирных кислот омега-6: омега-3 увеличилось в среднем на 65,4% на фоне снижения концентрации омега-6.

В настоящее время изучается действие бурых водорослей в качестве препаратов для профилактики ряда зооантропонозных инфекций. В опытах Sweeney T. et al. на фоне инфекции трехсуточных цыплят кампилобактером [5], установил, что экстракты ламинарина или ламинарина/фукоидана из бурой водоросли *Laminaria digitata* повысили поедаемость кормов, сопровождающуюся улучшением показателя конверсии, увеличили экспрессию ключевых генов резистентности, участву-

ющих в иммунном ответе (IL-6, IL-8 и т.д.). Ввод бурых водорослей обладал пребиотическим эффектом, приводя к увеличению высоты ворсинок в тонком кишечнике, так и скорости роста цыплят.

Наиболее исследованной, в отношении синтеза биологически активных веществ, является водоросль аскофиллум из семейства Фукусовые, входящая в состав ряда кормовых добавок отечественного и зарубежного производства, в частности, препарата «Tasco». Данный препарат даже при низких уровнях включения, проявляет высокую пребиотическую активность в отношении полезной микрофлоры кишечника, в 5,5 раз превышающую действие инулина. Добавка «Tasco» из бурой водоросли улучшает работу желудочно-кишечного тракта, повышает переваримость рациона за счет изменения микробиота [2].

Цель представленного исследования заключалась в изучении действия крупки из ламинарии на экспрессию генов организма кур-несушек кросса «Ломанн Белый».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Эксперимент был проведен на базе вивария Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина в соответствии со схемой в Таблице 1.

В ходе проведения опыта птицу яичного кросса «Ломанн Белый», 89 недель, разделили на 5 групп (24 головы в каждой) по принципу пар-аналогов. При этом учитывали интенсивность яйцекладки и массу яйца. Контрольная группа получала полнорационный комбикорм в соответствии с нормами кормления ВНИТИП (2019) [11].

После окончания научного эксперимента был проведен убой 5 особей из

каждой группы для отбора образцов тканевой матки и слепых отростков для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени была выполнена в Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина. Тотальную РНК из образцов выделяли вручную при помощи набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу. Количественная оценка выделенной РНК была выполнена на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью набора Qubit RNA BR (Broad

Range) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез кДНК из матрицы РНК проводили с помощью набора БиоМастер RNAscribe RT Plus (5×) (Биолабмикс, Россия) с использованием термостата «Гном» (ДНК-Технология, Россия). Полимеразная цепная реакция в реальном времени была выполнена на амплификаторе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) с использованием 96-луночных планшетов и с использованием мастер-микса БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия). Синтез олигонуклеотидов был выполнен в Российской биотехнологической компании «Евроген».

Таблица 1– Схема эксперимента на курах-несушках

п/п	Группы	Описание
1	Контрольная	Основной рацион в соответствии с рекомендациями для кросса(ОР)
2	1 Опытная	ОР + крупка из ламинарии 0,5 % (5 г/кг)
3	2 Опытная	ОР ++ крупка из ламинарии 1 % (10 г/кг)
4	3 Опытная	ОР ++ крупка из ламинарии 1,5 % (15 г/кг)
5	4 Опытная	ОР + фукусковая крупка 1,5 % (15 г/кг)

Температурный профиль реакции амплификации состоял из: 95°C в течение 10 минут; 40-45 циклов при 95°C в течение 15 секунд, включая отжиг праймеров по индивидуальной температуре в течение 30 секунд и 72°C в течение 30 секунд. Каждый образец исследовался в трех повторах на ПЦР планшете. Количество кДНК на каждую ПЦР реакцию составило 2 мкл при концентрации праймеров равной 0,32 мкМ. Нуклеотидная последовательность праймеров представлена в таблице 6. Расчёт экспрессии генов интереса относительно контрольного гена (ген домашнего хозяйства) был выполнен вручную с помощью Microsoft Office Excel с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak K.J., Schmitgen T.D., 2001) [3].

Статистическая обработка полученных данных включала вычисление среднего арифметического, определение стандартного отклонения, расчет достоверности по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В таблице 2 представлены результаты экспрессии генов, описывающие соотно-

шение значений генов интереса по отношению к контролю.

По данным таблицы 2, следует, что максимальный ввод в рацион ламинарии оказал недостоверное негативное влияние на экспрессию двух генов интереса. Также, высокий (1,5%) ввод крупки из ламинарии в комбикорм для несушек 3 фазы привел к снижению экспрессии гена ОСХ-32, отвечающего за формирование белка матрикса яичной скорлупы. Важно отметить, что ввод такого же количества фукуса пузырчатого не оказал аналогичного влияния на исследуемые гены.

Исходя из данных, представленных в Таблице 2, ввод в комбикорм ламинарии в минимальной дозировке способствовал повышению экспрессии генов, отвечающих за формирование скорлупы ОСХ-36, ОСХ-32, CALB1 на 40, 30 и 60 % соответственно. При этом уровень белка ОС-116 был недостоверно ниже контроля на 30 %. Противоположный результат отмечен с увеличением количества Ламинарии до 10 г/кг.

Таблица 2 – Результаты экспрессии по генам продуктивности (n=5)

Ген	Группа	Референсный ген, Ct	Ген интереса, Ct	ΔCt	$\frac{\Delta \Delta Ct}{Ct}$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$
1	2	3	4	5	6	7
ОСХ-36 Ген белка матрикса яичной скорлупы Овокаликсин-36, содержится во всех слоях скорлупы куриного яйца	(1)	25,04±0,687	21,87±0,653	-3,17	0	<i>1</i>
	(2)	24,19±0,146	20,55±0,779	-3,64	-0,47	<i>1,4</i>
	(3)	24,01±0,181	20,76±0,715	-3,26	-0,09	<i>1,1</i>
	(4)	23,94±0,278	22,28±1,466	-1,66	1,51	<i>0,4</i>
	(5)	24,02±0,067	20,91±0,594	-3,11	0,06	<i>1,0</i>
ОСХ-32 Ген белка матрикса яичной скорлупы Овокаликсин-32, обнаружен в наружных слоях яичной скорлупы и в кутикуле	(1)	25,04±0,687	13,99±0,822	-11,06	0	<i>1</i>
	(2)	24,19±0,146	12,71±0,327	-11,48	-0,42	<i>1,3</i>
	(3)	24,01±0,181	13,06±0,226	-10,96	0,10	<i>0,9</i>
	(4)	23,94±0,278	13,10±0,312	-10,83	0,22	<i>0,9</i>
	(5)	24,02±0,067	13,01±0,099	-11,01	0,04	<i>1,0</i>
ОС-116 Ген белка матрикса яичной скорлупы Овоклеидин, участвует в минерализации скорлупы и костей	(1)	25,04±0,687	13,41±1,840	-11,63	0	<i>1</i>
	(2)	24,19±0,146	12,99±1,343	-11,20	0,43	<i>0,7</i>
	(3)	24,01±0,181	11,19±0,325	-12,82	-1,19	<i>2,3</i>
	(4)	23,94±0,278	11,72±0,727	-12,22	0,58	<i>1,5</i>
	(5)	24,02±0,067	11,40±0,252	-12,62	0,99	<i>2,0</i>
CALB1 Ген кодирует белок Кальбиндин-1, который связывается с ионом Ca ²⁺ и отвечает за его перенос	(1)	25,04±0,687	23,34±0,537	-1,71	0	<i>1</i>
	(2)	24,19±0,146	21,79±1,164	-2,41	-0,70	<i>1,6</i>
	(3)	24,01±0,181	23,16±1,041	-0,85	0,86	<i>0,6</i>
	(4)	23,94±0,278	23,15±1,370	-0,79	0,92	<i>0,5</i>
	(5)	24,02±0,067	22,72±0,997	-1,30	0,41	<i>0,8</i>

Экспрессия гена овоклеидина-116 увеличилась на 130 %, незначительно снизилась экспрессия гена CALB1 на 40 %, а по двум другим генам белка матрикса яичной скорлупы нами отмечается разница в 10 %. Увеличение количества ламинарии до 15 г/кг оказало негативное

влияние на два представленных гена интереса, экспрессия которых недостоверно снизилась на 50 и 60 %. Однако, ввод такого же количества фукуса пузырчатого, не оказал никакого влияния на выработку белков овокаликсина-36 и овокаликсина-32, способствовал увеличению экспрес-

сии ОС-116 на 100 % и недостоверному снижению выработки белков гена кальбиндина-1 на 20 %.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, в ходе проведенного исследования было оценено действие крупки из ламинарии на экспрессию генов продуктивности кур-несушек. Ввод ламинарии 5 г/кг в рацион кур-несушек старшего возраста, способствовал положительной активации генов продуктивности (ОСХ-32, ОСХ-36, CALB1) на 30-60 %.

Полученные результаты являются основой для разработки новых биотехнологий, способствующих продлению срока продуктивного использования кур-несушек промышленных кроссов благодаря улучшению показателей яйценоскости.

С целью повышения показателей яичной продуктивности, а также увеличения экспрессии генов продуктивности и резистентности яичных кур, рекомендуем включать в рационы кур-несушек биологически активную добавку из ламинарии из расчета 5 г/кг корма.

STUDY OF THE EFFECT OF LAMINARIA CRUSH ON THE EXPRESSION OF PRODUCTIVITY GENES IN THE BODY OF LAYING HENS

Kochish I.I.¹ – Holder of an Advanced Doctorate (Doctor of Science) in Agricultural Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Zoo hygiene and Poultry Farming named after A.K. Danilova (ORCID 0000-0002-8502-6052); **Zimin E.E.**¹ – postgraduate student (ORCID 0009-0007-9244-7334); **Nikonov I.N.**^{2*} – Ph.D. of Biological Sciences, Senior Lecturer (ORCID 0000-0001-9495-0178).

¹Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Scriabin

²St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

* ilnikonov@yandex.ru

Financing: The study was carried out at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biology-Master of Medical Sciences named after K.I. Skryabin using the grant of the Russian Science Foundation No. 22-16-00009, <https://rscf.ru/project/22-16-00009/>.

ABSTRACT

In animal diets, due to the rejection of antibiotics and growth stimulants, alternative and safe additives are needed to improve their health and well-being. In this regard, biologically active components of plant origin, such as extracts and infusions from herbs and wood, dry plant biomass, including algae, are becoming relevant. According to many authors, seaweed can be used in poultry farming as part of feed components and feed additives both to improve the immune status and to normalize the microflora in the digestive tract. The recommended dosages of algae used to improve the quality of the resulting products range from 1% to 5% of dry weight. The purpose of the presented study was to study the effect of kelp grits on the expression of genes in the body of laying hens of the Lohmann White cross. The work used zootechnical methods and molecular biology methods. During the study, the effect of kelp grits on the expression of productivity genes in laying hens was assessed. The introduction of kelp at a rate of 5 g / kg into the diet of older laying hens contributed to the positive activation of productivity genes (ОСХ-32, ОСХ-36, CALB1) by 30-60%. The obtained results are the basis for the development of new biotechnologies that help extend the period of productive use of industrial cross-breed laying hens by improving egg production indicators. In order to increase egg production indicators, as well as to increase the expression of productivity and resistance genes of egg-laying hens, we recommend including a biologically active additive of kelp in the diets of laying hens at a rate of 5 g / kg of feed.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abudabos, A.M. Nutritional value of green seaweed (*ulva lactuca*) for broilers / A.M. Abudabos, A. Okab, R.S. Aljumaah et al. // *Italian Journal of Animal Science*. - 2016. - 12(28). - P. 177-181.

2. Evans, F.D. Seaweeds for animal production use / F.D. Evans, A.T. Critchley // *Journal of Applied Phycology*. - 2014. - P. 891-899.

3. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. - 2001. - 25(4). - P. 402-408.

4. Wang, S.B. Enteromorpha prolifera supplemental level: effects on laying performance, egg quality, immune function and microflora in feces of laying hens / S.B. Wang, Y.H. Jia, L.H. Wang et al. // *Chinese Journal of Animal Nutritional*. - 2013. - 25(6). - P. 1346-1352.

5. Wang, S.B. Enteromorpha prolifera: effects on performance, carcass quality and small intestinal digestive enzyme activities of broilers / S.B. Wang, X.P. Shi, C.F. Zhou et al. // *Chinese Journal of Animal Nutrition*. - 2013. - 25(6). - P. 1346-1352.

6. Баркова, О.Ю. Обзор генов, улучшающих яичную продуктивность несушек // *Птицеводство*. - 2018. - №8. - С. 2-5.

7. Кочиш, И.И. Методические рекомендации по применению антимикробной кормовой добавки для профилактики стрессов у промышленных кроссов кур-несушек / И.И. Кочиш, М.Н. Романов, И.Н. Никонов и др. // М.: Издательство «Сельскохозяйственные технологии». - 2021. - 46 с.

8. Кочиш, И.И. Морские водоросли: потенциал использования в рационах сельскохозяйственных животных (обзор) / И.И. Кочиш, Е.Е. Зимин, И.Н. Никонов и др. // *Сельскохозяйственная биология*. - 2023. - Т.58, №6. - С. 1006-1020.

9. Наумова, Л.И. Влияние нетрадиционной кормовой добавки на продуктивные качества кур-несушек / Л.И. Наумова, А.А. Лукашина // *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. - 2020. - №4. - 5 с.

10. Наумова, Л.И. Кормовые добавки наземного и морского генеза в рационах несушек / Л.И. Наумова // *Птицеводство*. - 2017. - №12. - С. 20-22.

11. Руководство по кормлению сельскохозяйственной птицы / И. А. Егоров, В. А. Манукян, Т. Н. Ленкова и др. // ФГБНУ Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства" Российской академии наук. - Москва: Лика. - 2019. - 226 с.

REFERENCES

1. Abudabos, A.M. Nutritional value of green seaweed (*ulva lactuca*) for broilers / A.M. Abudabos, A. Okab, R.S. Aljumaah et al. // *Italian Journal of Animal Science*. - 2016. - 12(28). - P. 177-181.

2. Evans, F.D. Seaweeds for animal production use / F.D. Evans, A.T. Critchley // *Journal of Applied Phycology*. - 2014. - P. 891-899.

3. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. - 2001. - 25(4). - P. 402-408.

4. Wang, S.B. Enteromorpha prolifera supplemental level: effects on laying performance, egg quality, immune function and microflora in feces of laying hens / S.B. Wang, Y.H. Jia, L.H. Wang et al. // *Chinese Journal of Animal Nutritional*. - 2013. - 25(6). - P. 1346-1352.

5. Wang, S.B. Enteromorpha prolifera: effects on performance, carcass quality and small intestinal digestive enzyme activities of broilers / S.B. Wang, X.P. Shi, C.F. Zhou et al. // *Chinese Journal of Animal Nutrition*. - 2013. - 25(6). - P. 1346-1352.

6. Barkova, O.Yu. Review of genes improving egg productivity of laying hens // *Poultry farming*. - 2018. - No. 8. - P. 2-5.

7. Kochish, I.I. Methodical recommendations for the use of an antimicrobial feed additive for the prevention of stress in industrial crosses of laying hens / I.I. Kochish, M.N. Romanov, I.N. Nikonov, et al. // М.:

Agricultural Technologies Publishing House. - 2021. - 46 p.

8. Kochish, I.I. Seaweed: Potential use in the diets of farm animals (review) / I.I. Kochish, E.E. Zimin, I.N. Nikonov et al. // *Agricultural Biology*. - 2023. - Vol. 58, No. 6. - P. 1006-1020.

9. Naumova, L.I. The influence of non-traditional feed additive on the productive qualities of laying hens / L.I. Naumova, A.A. Lukashin // *Bulletin of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences*. - 2020. - No. 4. - 5 p.

10. Naumova, L.I. Feed additives of terrestrial and marine genesis in the diets of laying hens / L.I. Naumova // *Poultry farming*. - 2017. - No. 12. - P. 20-22.

11. Guide to feeding agricultural poultry / I.A. Egorov, V.A. Manukyan, T. N. Lenkova, et al. // Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming" of the Russian Academy of Sciences. - Moscow: Lika. - 2019. - 226 p.