

# Влияние пребиотика на основе бутирата на микрофлору кишечника и экспрессию генов резистентности у кур-несушек кросса Ломанн Браун

**Кочиш И.И.**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой зооигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой

**Элькоми Х.С.**, аспирант кафедры зооигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой

**Мясникова О.В.**, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры зооигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой  
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии (МГАВМиБ) – МВА им. К.И. Скрябина

**Брылин А.П.**, кандидат ветеринарных наук, генеральный директор  
ООО «Провет», Москва

**Аннотация:** Изучено влияние бутират-содержащего пребиотического препарата Бутифор F на количественный и качественный состав микробиоты слепых отростков кишечника и экспрессию генов, связанных с резистентностью, у кур-несушек кросса Ломанн Браун. Было обнаружено, что добавление пребиотика к корму (750 г/т) привело к достоверному увеличению в слепых отростках численности бактерий филума *Actinobacteria* в 3,5 раза, в т.ч. порядка *Bifidobacteriales* – в 2,7 раза ( $P < 0,05$ ), увеличению численности бактерий семейства *Lactobacillaceae* на 135% ( $P < 0,05$ ) и снижению общего количества патогенной и нежелательной микрофлоры на 44%. Также было показано, что введение кормовой добавки снизило по сравнению с контролем экспрессию в тканях кишечника генов  $\beta$ -дефензина 9 и галлинацина-10 в 1,5 раза, интерлейкина 8 – в 1,3 раза и проэнкефалина – в 1,9 раза. Сделан вывод, что пребиотик положительно влияет на состояние кишечной микрофлоры и иммунную систему кур-несушек.

**Ключевые слова:** куры-несушки, пребиотик, бутират, микробиота слепых отростков, экспрессия генов, гены резистентности.

**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 применением интенсивной технологии при производстве яиц [1].

Отрасль достигла огромного прогресса за последние 50 лет за счет улучшения генетической структуры поголовья и достижений в области кормления [2,3]. В настоящее время кормовые до-

бавки играют важную роль в птицеводстве из-за широкого спектра полезных эффектов, таких как стимуляция роста и продуктивности, повышение иммунитета и т.д. [4,5].

Актуальной проблемой птицеводства последних лет является широкое распространение резистентных форм патогенных микроорганизмов. В результате применения антибиотиков угнетается микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), ослабляется иммунитет [6]. Многие из них накапливаются в продуктах птицеводства, представляя опасность для человека. Поэтому применение альтернативных антибио-

тиков препаратов (пребиотики, пробиотики, фитобиотики и др.), улучшающих здоровье птицы и качество получаемых продуктов, но не представляющих опасности для человека, имеет большой практический интерес как для производителей, так и для потребителей птицеводческой продукции [7,8].

Введение пребиотиков в корма улучшает пищеварительную функцию ЖКТ птицы, положительно влияет на продуктивность, а также увеличивает живую массу и улучшает конверсию корма [9,10]. Применение пребиотиков способствует развитию молочнокислых бактерий и других по-





лезных микроорганизмов и подавляет рост патогенной микрофлоры в ЖКТ [11-13].

Использование пребиотиков у кур-несушек привело к положительным результатам за счет увеличения популяции определенных полезных бактериальных родов в кишечнике. Например, пребиотики увеличивают численность бактерий родов *Lactobacillus* и *Olsenella* в кишечнике несушек и экспрессию генов, связанных с метаболизмом пропионата и бутирата [14,15].

Применение пребиотиков и пробиотиков положительно влияет на микрофлору кишечника здоровых кур-несушек. Изученные биологически активные добавки оказали разнонаправленное действие на функциональную активность генов, связанных с иммунитетом (*AvBD9*, *IL8*, *PENK*, *Gal-10*) [16].

В настоящее время получены новые формы альтернативных антибиотикам препаратов, отвечающие современным требованиям сельскохозяйственного производства. В качестве такой альтернативы разработана пребиотическая кормовая добавка Бутифор F (IMPEXTRACO, Бельгия; дистрибьютор в России – ООО «ПРОВЕТ»), содержащая до 35% кальция бутирата, покрытого специальной защитной оболочкой, кальция лактат (30-33%) и танины (12-16%) [17].

Исследования отечественных и зарубежных ученых показали, что кормовые добавки на основе бутиратов увеличивают продуктивность, обладают иммуностимулирующими свойствами, подавляют провоспалительные метаболические пути, положительно влияют на микробиоту ЖКТ. Та-

ким образом, используя бутираты в кормах для птицы, можно избежать многих трудностей, связанных с регулированием кишечной микробиоты [18-20].

Бутират питает стенки толстой кишки, поддерживает здоровую слизистую оболочку и барьерную функцию, предотвращает воспаление кишечника [21-23], в тонком кишечнике индуцирует выработку защитных антимикробных пептидов, которые стимулируют развитие и обновление тканей за счет увеличения пролиферации клеток и развития ворсинок [24]; все это приводит к улучшению усвоения питательных веществ.

Целью исследования была оценка влияния пребиотического препарата Бутифор F на состав микробиоты слепых отростков кишечника и экспрессию генов, связанных с иммунитетом, у кур-несушек.

**Материал и методика исследований.** Исследования проводили в условиях вивария международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы кафедры зооигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой МГАВМиБ в 2021 г. на курах-несушках кросса Ломанн Браун. Кур в 20-недельном возрасте размещали в клетках индивидуального содержания для предварительного определения интенсивности яйцекладки. В возрасте 28 недель из них сформировали 2 группы (контрольная и опытная) по 10 голов с интенсивностью яйцекладки не ниже 95%.

Все куры получали стандартный рацион, соответствующий по питательности принятым нормативам. Куры опытной группы получали изучаемую добавку в течение 28 сут. из расчета 750 г/т

корма. В течение опыта яйценоскость учитывали ежедневно, интенсивность яйцекладки рассчитывали еженедельно. Массу яиц и живую массу птицы определяли еженедельно на основе индивидуального взвешивания на электронных весах ME-R 326AFU (Mercury Equipment, Китай).

После окончания опыта по 5 особей из каждой группы подвергли эвтаназии. Фрагменты ткани слепых отростков и их содержимое отбирали для оценки экспрессии генов  $\beta$ -дефензина 9, галлинацина-10, интерлейкина 8 и проэнкефалина и определения количественного и качественного состава микробиоты. Для выделения микробной ДНК использовали набор QIAamp Power Fecal DNA Kit (Qiagen, США), в соответствии с рекомендациями производителя, выделение проводили при помощи автоматической станции QIAcube connect. Количество полученной ДНК измеряли на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США).

Общее микробное число (содержание всех микроорганизмов на единицу объема) устанавливали с помощью количественной ПЦР (qPCR) на амплификаторе Light Cycler® 96 System (Roche, Швейцария) с применением смеси Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) с детекцией на основе флуоресцентного красителя SYBR Green; праймеры Eub338 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' и Eub518 5'-ATTACCGCGGCTCGC-3' (Евроген, Россия). Для определения микробного состава выделенную ДНК обрабатывали с использованием набора 16S Metagenomik Kit и Ion 520 & Ion 530TM Kit-OT2 (Thermo Fisher



**Таблица 1. Праймеры, использованные для оценки экспрессии генов, связанных с резистентностью у кур кросса «Ломанн Браун»**

Ген	Праймеры
<i>TBP</i> (ген «домашнего хозяйства»)	F: AGCTCTGGGATAGTCCACAG R: ATAATAACAGCAGCAAAACGCTTG
<i>IL8</i> (интерлейкин 8)	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGA R: TAACATGAGGCACCGATGTG
<i>AvBD9</i> (β-дефензин 9)	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGA R: TAACATGAGGCACCGATGTG
<i>Gal-10</i> (галлацин-10)	F: GCTCTTCGCTGTTCTCCTCT R: CCCAGAGATGGTGAAGGTG
<i>PENK</i> (проэнкефалин)	F: GCTGGATGAGAACCATCTGC R: AGCCTCCGTACCTCTTAGCC

Scientific, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя для загрузки на чип для NGS-секвенирования, которое осуществляли на приборе Ion Gene Studio™ S5 System (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Общее число прочтений при анализе – 2 млн. по 300-400 п.н., в среднем по 211000 ридов на образец. Анализ результатов секвенирования для определения микробного состава проводили с помощью сетевого программного продукта Ion Reporter (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>).

Для изучения экспрессии генов, связанных с иммунитетом, из фрагментов ткани слепых отростков выделяли тотальную РНК вручную при помощи набора RNeasy Midi Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Контроль качества суммарной РНК проводился на флуориметре Qubit 3.0 с применением набора Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез кДНК на матрице суммарной РНК (реакцию обратной транскрипции) проводили при помощи набора iScript RT Supermix (BioRad, США) на термостате ГНОМ.

Реакцию амплификации с праймерами генов интереса проводили при помощи набора Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master

Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя, реакцию проводили в стандартных 96-луночных оптических планках Corning Axygen® PCR-96-LP-FLT-C на амплификаторе Light Cycler® 96 System (Roche, Швейцария). В качестве референсного использовали ген ТАТ-связывающего белка *TBP* (ген «домашнего хозяйства»). В ПЦР-ПВ по каждому из референсных и искомым генов учитывали пороговый цикл флуоресценции *Ct*. При обработке результатов рассчитывали средние значения пороговых циклов по группе и вычисляли  $\Delta Ct$  (разность значений пороговых циклов между искомым геном и геном «домашнего хозяйства»), а также разность значений  $\Delta Ct$  между опытной и контрольной группами  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_2 - \Delta Ct_1$ . Относительную экспрессию генов рассчитывали по числу пороговых циклов, нормализованных относительно контроля  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [25].

Гены, связанные с иммунитетом, и праймеры, которые мы использовали при изучении их экспрессии у птицы, получавшей пребиотик, приведены в табл. 1.

Математическую и статистическую обработку данных проводили стандартными методами корреляционного и дисперсионного анализа с применением программ-

ного обеспечения Excel 2007. Для показателей рассчитывали средние (*M*) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ). Различия считали статистически значимыми при  $P < 0,05$ . Каждую пробу кДНК исследовали методом ПЦР-ПВ в трех повторностях. Оценку биологического разнообразия и обработку данных по микробиоте проводили на биоинформатической платформе Qiime 2.0 (<https://qiime2.org/>) в сетевом приложении Ion Reporter.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Изучаемая добавка, по данным производителя, способствует поддержанию правильного микробиоценоза кишечника птиц, подавляет рост патогенной микрофлоры и способствует развитию полезной микрофлоры; в качестве основного действующего вещества препарат содержит кальция бутират.

Бутират считается источником энергии для энтероцитов, стимулирует выработку пищеварительных ферментов, способствуют развитию кишечных ворсинок, поддерживает структурную целостность ворсинок, обеспечивая барьерную функцию кишечника, оказывает противовоспалительное действие [23,24]. Таким образом, это приводит к лучшему развитию кишечных ворсинок. Известно, что бутират кальция снижает pH слизистой оболочки кишечника, что создает кислую среду, необходимую для роста нормальных комменсалов [26].

Добавление бутирата кальция к рациону привело к повышению устойчивости к бактериальному заражению, что можно объяснить двумя механизмами: противовоспалительным эффектом и усилением защитного барьера кишечника. Цитокины – это белки или



пептиды, секретируемые клетками, которые играют роль в иммунных и воспалительных ответах за счет активации других клеток и тканей [24].

На рис. 1 приведены результаты анализа изменения микробных профилей (%) содержимого слепых отростков кишечника кур при скармливании пребиотика. Филумы *Firmicutes* и *Bacteroidetes* доминировали в слепой кишке кур обеих групп (рис. 1а), при этом доля бактерий филума *Firmicutes* в опытной группе была достоверно выше контроля ( $P < 0,05$ ), а доля филума *Bacteroidetes* была на 12,32% меньше.

Ранее было показано, что бактерии филумов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* являются доминирующими бактериями в слепой кишке, составляя до 80% всей микробиоты [27]. Известно, что в кишечнике млекопитающих также преобладают бактерии этих филумов, связанные с метаболизмом короткоцепочечных жирных кислот. Было также показано, что бактерии филума *Firmicutes* синтезируют бутират и пропионат, а *Bacteroidetes* синтезируют пропионат,  $\alpha$ -амилазу,  $\alpha$ -1,2-маннозидазу и эндо-1,4- $\beta$ -маннозидазу, а также расщепляют крахмал и другие полимерные вещества [28].

Бактерии порядка *Bifidobacteriales* могут синтезировать и снабжать организм витаминами, а микроорганизмы рода *Lactobacillus* необходимы для кишечной микробиоты, т.к. они обеспечивают организм питательными веществами и защищают от условно-патогенной микрофлоры [29].

В опытной группе численность бактерий филума *Actinobacteria* достоверно увеличилась в 3,5 раза по сравнению с контрольной груп-

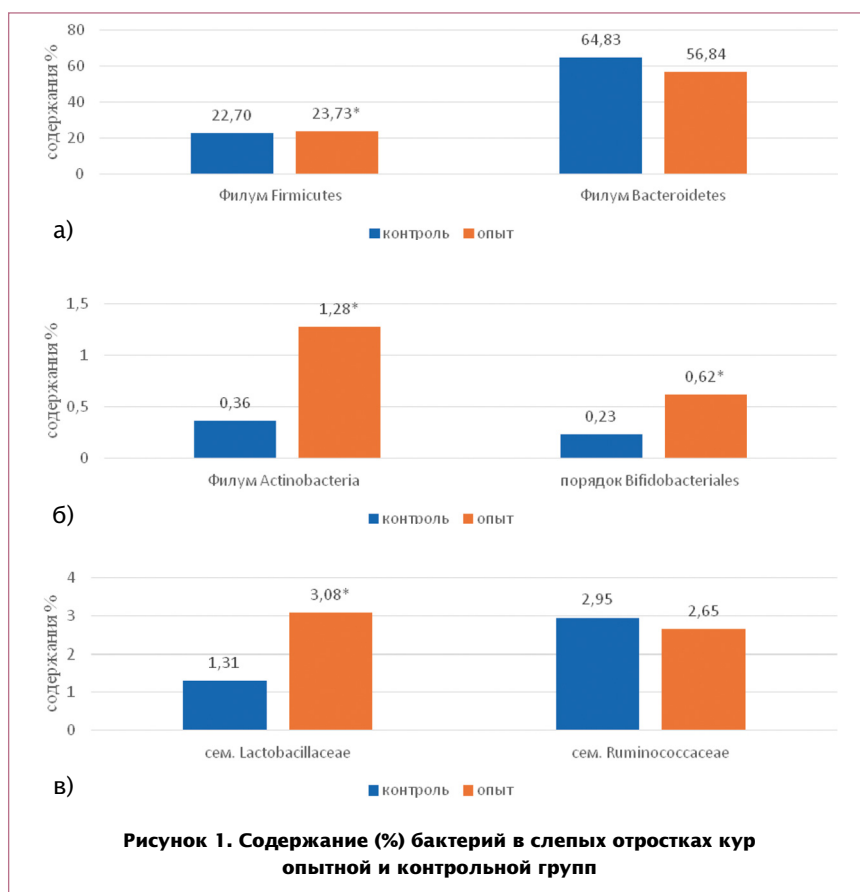


Рисунок 1. Содержание (%) бактерий в слепых отростках кур опытной и контрольной групп

Таблица 2. Общее микробное число в содержимом слепых отростков у кур

Показатель, $\times 10^7$	Контроль	Опыт
X $\pm$ m	1,00 $\pm$ 0,44	0,99 $\pm$ 0,09
Min	0,4629	0,7453
Max	2,476	1,145
d	2,0131	0,3997

пой, в т.ч. бактерий порядка *Bifidobacteriales* – в 2,7 раза ( $P < 0,05$ ). Было отмечено также достоверное увеличение бактерий семейства *Lactobacillaceae* на 135%, при этом численность целлюлозолитических бактерий семейства *Ruminococcaceae* сократилась на 10,16% (рис. 1б,в).

Скармливание пребиотика привело к достоверному уменьшению патогенной и нежелательной микрофлоры на 44%: 3,21% в опытной группе против 5,72% в контроле. Колонизация ЖКТ полезной микрофлорой (*Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriales*) способствует умень-

шению количества патогенных или условно-патогенных микроорганизмов, поддержанию оптимальной кислотности среды, профилактике дисбиоза, стимуляции факторов местного и общего иммунитета [16].

Высокое содержание лактобацилл и бифидобактерий в микробиоте кишечника ранее обнаруживали у цыплят, получавших добавки пребиотиков [30,31]. В исследованиях, посвященных изменениям микробиоты у кур-несушек, сообщалось об увеличении числа бифидо- и целлюлозолитических бактерий в кишеч-



Таблица 3. Экспрессия генов резистентности в тканях слепых отростков кишечника кур

Ген	Группа	ТВР	Экспрессия гена	ΔCt	ΔΔCt	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
<i>AvBD 9</i>	контроль	24,27±1,54	28,36±1,39	4,08	-	1,00
	опыт	24,48±0,84	28,67±0,81	4,19	0,10	0,66
<i>GAL-10</i>	контроль	24,27±1,54	24,77±0,78	0,57	-	1,00
	опыт	24,48±0,84	24,10±0,68	0,29	-0,29	0,64
<i>IL-8</i>	контроль	24,27±1,54	24,05±1,14	-0,22	-	1,00
	опыт	24,48±0,84	24,10±0,68	-0,38	-0,15	0,78
<i>PEHK</i>	контроль	24,27±1,54	24,37±1,20	0,10	-	1,00
	опыт	24,48±0,84	24,23±0,62	-0,25	-0,34	0,72

нике и снижении численности патогенной и нежелательной микрофлоры на 25-50% [16].

В недавнем исследовании на курах-несушках было показано, что выпаивание пребиотика Ветелакт привело к увеличению численности в слепых отростках бактерий филума *Actinobacteria*, в том числе порядка *Bifidobacteriales* – в 10 раз. Также получено достоверное увеличение бактерий порядка *Lactobacillales* на 183,33% в опытной группе по сравнению с контролем [32].

Использование пробиотика Профорт привело к увеличению численности бактерий филумов *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, участвующих в переваривании кормов, но также привело к увеличению численности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов филумов *Synergistetes* и *Tenericutes*. Скармливание пробиотической добавки СУБ-ПРО положительно повлияло на микробиом ЖКТ, снизив численность патогенных бактерий [33].

В нашем опыте общее число микроорганизмов в опытной и контрольной группах было примерно одинаковым, соответствовало нормативу и не имело статистических различий (табл. 2). Применение пребиотика Ветелакт несколько увеличивало общее число микроорганизмов в

кишечном содержимом и, наоборот, скармливание пробиотика снижало этот показатель. Однако выявленные различия между группами были недостоверными и носили характер тенденции [16].

Эндогенные пептиды β-дефензин 9 и галлинацин-10 являются важным элементом врожденной иммунной системы и связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом. Дефензины, будучи катионными пептидами, активны в отношении бактерий, грибов, оболочечных и безоболочечных вирусов. Иммунные клетки используют дефензины для уничтожения бактерий, поглощенных при фагоцитозе [34]. Ранее сообщалось, что скармливание курам пребиотика и пробиотика привело к достоверному уменьшению экспрессии гена *AvBD9* (соответственно в 5,0 и 3,3 раза), а также экспрессии гена *IL8*, но в меньшей степени [16].

В наших исследованиях наблюдались различия между группами по экспрессии генов β-дефензина 9 и галлинацина-10 в ткани кишечника (табл. 3). У птицы, потреблявшей пребиотик, экспрессия генов *AvBD9* и *GAL-10* снижалась в 1,5 раза по сравнению с контролем. Провоспалительные цитокины, а также микроорганизмы индуцируют экспрессию

β-дефензина в кишечнике [35]. Снижение потребности в провоспалительных цитокинах в нашем опыте (что отразилось на уровне синтеза β-дефензина 9 и галлинацина-10), по-видимому, является результатом уменьшения количества патогенных микроорганизмов.

Интерлейкин-8, белок класса цитокинов и маркер хронических и острых воспалений, является важным фактором воспалительных и иммунных реакций. В нашем опыте экспрессия гена интерлейкина 8 (*IL8*) под воздействием пребиотика снизилась в 1,3 раза (табл. 3).

Бутират подавляет активность клеток и белков, которые вызывают воспаление [36]. В одном исследовании на клетках человека бутират резко снижал активность интерлейкина-12 (*IL-12*), провоспалительного цитокина, при одновременном повышении интерлейкина-10 (*IL-10*), который в целом является противовоспалительным [37].

У мышей бутират-содержащие кормовые волокна противодействовали воспалению, индуцированному бактериальными токсинами. К воспалительным цитокинам, ингибируемым бутиратом, относятся интерлейкин-1 (*IL-1*), фактор некроза опухоли-альфа (*TNF-α*) и интерферон-гамма (*INF-γ*) [38].





Результаты эксперимента на цыплятах-бройлерах показали снижение экспрессии ряда генов провоспалительных факторов (*IL6*, *IL8*, *AvBD2*, *AvBD9*) при скармлировании пробиотика, синбиотика и подкислителя на фоне инфекции *E. coli* [39].

Проэнкефалин играет роль в ряде физиологических функций, включая реакцию на боль и стресс. В нашем опыте экспрессия гена проэнкефалина (*PENK*) при скармливании пребиотика была в 1,4 раза меньше, чем в контроле (табл. 3). Однако в одной из предыдущих работ экспрессия гена проэнкефалина (*PENK*) под воздействием пробиотика повысилась в 1,11 раза ( $P>0,05$ ), под воздействием пре-

биотика Ветелакт – в 1,91 раза ( $P<0,05$ ) [16].

**Заключение.** На основании полученных данных можно сделать вывод, что добавление пребиотика Бутифор F к корму положительно воздействовало на микрофлору кишечника кур-несушек. Пребиотик способствовал увеличению в слепых отростках числа бифидо- и целлюлолитических бактерий и снижал общее количество патогенной и нежелательной микрофлоры на 44%. Показано избирательное действие пребиотика на различные типы бактерий в кишечнике, подтвержденное экспрессией генов, связанных с иммунитетом. Также показано, что препарат влияет на уровень

экспрессии генов резистентности (*AvBD9*, *GAL-10*, *IL-8*, *PENK*), что свидетельствует о его положительном влиянии на иммунную систему кур.

**Список литературы предоставляется авторами по запросу, а также доступен в описании статьи на сайте eLibrary.ru.**

**Для контакта с авторами:**

**Кочиш Иван Иванович**

**E-mail: kochish.i@mail.ru**

**Элькоми Хассан Саад**

**E-mail: hassan.elkomy@alexu.edu.eg**

**Мясникова Ольга Вячеславовна**

**E-mail:**

**omyasnikova71@gmail.com**

**Брылин Александр Павлович**

**E-mail: brylin@list.ru**

### **Effects of a Butirate Based Prebiotic on the Cecal Microbiota and Expression of the Disease Resistance Related Genes in Lohmann Brown Laying Hens**

Kochish I.I.<sup>1</sup>, Elkomy H.S.<sup>1</sup>, Myasnikova O.V.<sup>1</sup>, Brylin A.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA of K.I. Skryabin; <sup>2</sup>“Provet” LCC, Moscow

**Summary:** The effects of prebiotic preparation Butifor-F (based on calcium butirate) on the qualitative and quantitative composition of cecal microbiota and cecal expression of disease resistance related genes in laying hens (cross Lohmann Brown) were studied. It was found that the prebiotic (750 ppm) significantly ( $P<0.05$ ) increased in compare to control cecal concentration of the bacterial species from phylum Actinobacteria (3.5-fold) including order Bifidobacteriales (2.7-fold) and from family Lactobacillaceae (by 135%); the decrease in the total percentage of pathogenic and other undesirable geni by 44% was also found. The substantial decreases in the expression of certain disease resistance related genes in the ceca of the prebiotic-fed hens in compare to control were detected: expression of genes of  $\beta$ -defensin-9 and gallinacin-10 decreased 1.5-fold, interleukin-8 1.3-fold, and proenkephalin 1.9-fold. The conclusion on the beneficial effect of the prebiotic on the cecal microbiota and immune system in laying hens was made.

**Keywords:** laying hens, prebiotic, butirate, composition of cecal microbiota, cecal expression of disease resistance related genes.

#### ОТРАСЛЕВЫЕ НОВОСТИ

### **Казахстан просит об отмене запрета на ввоз продукции птицеводства в Россию**

Министерство торговли и интеграции Казахстана отправило в Минпромторг РФ письмо с просьбой о содействии в отмене ограничений на ввоз птицеводческой продукции из Казахстана в Россию.

По данным Союза птицеводов Республики Казахстан, запрет, обусловленный вспышкой высокопатогенного гриппа птиц, был введен осенью 2021 года. С тех пор прошло более трех месяцев, эпизоотическая ситуация в промышленном птицеводстве стабилизировалась, все ветеринарно-санитарные мероприятия в очагах завершены.

**Источник: meat-expert.ru**