

Ключ к защите птицы от теплового стресса

Г. Лаптев, Е. Йылдырым, Л. Ильина, Д. Тюрина, А. Дубровин, В. Филиппова, Н. Новикова, В. Меликиди, Е. Горфункель, А. Дубровина, К. Калиткина, ООО «БИОТРОФ»

Для отрасли птицеводства лето — напряженный период, поскольку в это время на многих предприятиях, особенно в южных регионах страны, птица испытывает тепловой стресс. Перегрев поголовья обходится дорого.

Стресс запускает каскад регуляторных механизмов, приводящих к расходу энергии и изменению метаболизма, что отрицательно сказывается на иммунитете, сохранности поголовья, конверсии корма, продуктивности, выводимости, сроке хозяйственного использования и качестве получаемого мяса и яйца. Так, рядом исследований показано, что в среднем тепловой стресс снижает потребление корма на 50%, прирост живой массы — на 30%, яйценоскость — на 30%, толщину скорлупы — на 20%. Это свидетельствует о необходимости поиска методов диагностики стрессовых состояний и мер их предупреждения.

Усугубляющие факторы

В условиях теплового стресса поддержание термического гомеостаза (постоянства среды) в организме птицы выражается в повышении уровня активных форм кислорода. Как следствие, организм вступает в стадию окислительного стресса, что сопровождается усилением экспрессии (активности) до 400 генов, которые оказывают противоречивое воздействие на птицу. С одной стороны, они играют важную регуляторную роль в адаптации, с другой — влекут негативные последствия из-за истощения ресурсов организма.

Среди таких генов — гены белков «теплового шока» шаперонов (HSF), которые представляют собой «первый эшелон» обороны от негативных последствий перегрева. Шапероны обладают способностью распознавать неправильно свернутые белки, связывать и предотвращать необратимую агрегацию денатурированных (свернувшихся) белков, ингибировать неправильное сворачивание белка.

Важно, что на активацию шаперонов, помимо теплового излучения, может также оказывать влияние целый спектр различных стресс-факторов: воздействие химических веществ, токсинов кормов и тяжелых металлов, смена рациона, иммунологические стрессы (такие как паразитарная или бактериальная инфекция, воспаление). Как известно, в условиях интенсивного ведения птицеводства поголовье одновременно испытывает различные стрессовые состояния на протяжении всего периода выращивания.

Как оказалось, среди множества стрессов, влияющих на растущую птицу, остаточные количества пестицидов в кормах — одно из основных неизбежных воздействий. Так, мы продемонстрировали широкую распространенность и превышение допустимой нормы глифосата в комбикормовом сырье и в полнорационных комбикормах для сельскохозяйственной птицы. Глифосат (препарат Раундап) является самым широко используемым гербицидом для борьбы с сорняками в мире.

Впервые в России, в рамках гранта Российского научного фонда № 22-16-00128 (руководитель — д-р биол. наук Лаптев Г.Ю.), мы провели исследование влияния глифосата на транскриптом (дифференциальную экспрессию всех генов, присутствующих в геноме) сельскохозяйственной птицы с помощью высокопроизводительного RNA-seq. Дело в том, что не только ДНК обуславливает признаки организма. Важным механизмом, определяющим, насколько будут активны те или иные гены, является экспрессия генов, которая происходит на этапе синтеза РНК.

Был поставлен эксперимент на бройлерах кросса «Росс 308», которых поделили на 4 группы: контрольная группа получала основной рацион (ОР) без введения глифосата, 1-я опытная — ОР с добавлением глифосата в дозе 10 мг/кг корма, что соответствовало 0,5 ПДК для продуктов питания (СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания»); 2-я опытная — ОР с добавлением глифосата на уровне 1 ПДК; 3-я опытная — ОР с добавлением глифосата в 5 ПДК.

Анализ выполняли при использовании наборов TruSeq Stranded mRNA и MiSeq Reagent Kit v3 150 cycle (Illumina). В результате биоинформатической обработки данных при помощи программного обеспечения Salmon удалось получить исчерпывающую информацию об изменениях транскриптома в ответ на влияние гербицида: экспрессии 33 тысячи генов. Оказалось, что на фоне глифосата происходила активация генов белков-шаперонов *HSPB9*, *Hsp40*, *Hsp70*, *HSP90B1* до 7,4 раза.

Представляется вероятным, что напряжение системы защиты организма, включающей белки-ша-

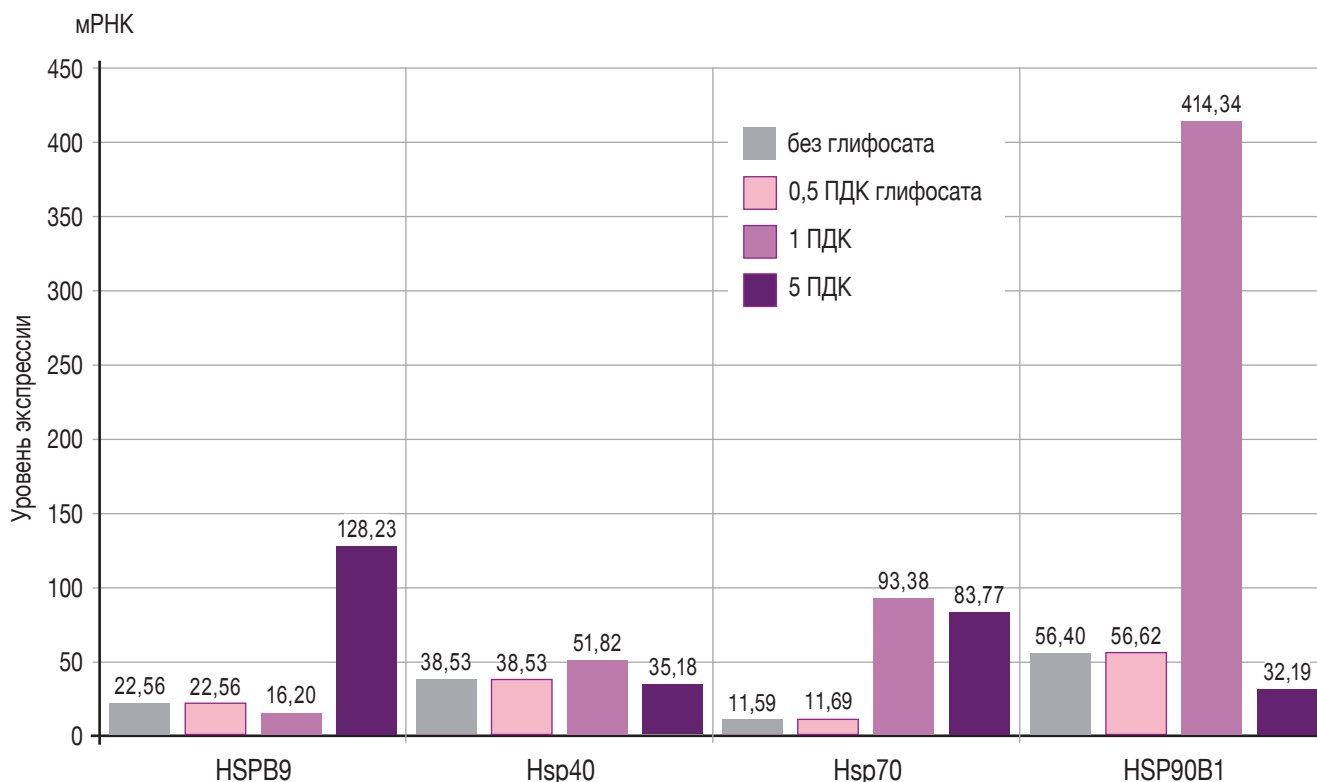


Рис. 1. Влияние глифосата кормов на изменение экспрессии белков-шаперонов бройлеров (исследование с помощью метода высокопроизводительного RNA-seq)

пероны, является одним из ключевых механизмов при стрессах, связанных с токсикантами кормов. То есть, с одной стороны, при воздействии кормовых токсинов наблюдается перегрузка и дисбаланс собственной системы адаптации организма к повышенным температурам. Таким образом, в условиях интенсивного ведения птицеводства и синергетического действия различных стрессоров птица утрачивает природную способность сопротивления перегреву.

Кроме того, известно, что, несмотря на защитную роль шаперонов, усиленная их активация может приводить к истощению собственных энергетических ресурсов организма. Поэтому, с другой стороны, этот процесс неизбежно приводит к снижению продуктивности и других показателей, обеспечивающих экономическую эффективность отрасли.

Каскадный механизм развития теплового стресса

Известно, что орган, который особенно чувствителен к тепловому стрессу, — это кишечник. Нарушение критического элемента организма — кишечного барьера — было признано отправной точкой негативных последствий теплового стресса для здоровья и продуктивности животных и птицы.

Дело в том, что организм-хозяин тесно связан с симбиотическим микробиомом, его населяющим. Тепловой же стресс приводит к нарушению баланса микрофлоры кишечника птицы: доля нормофлоры снижается, возрастает количество токсинообразующих энтеробактерий и клостридий. Это связано

с тем, что на фоне перегрева происходит синтез соединений, изменяющих состав микробиоты кишечника и подавляющих ее функции. Затем следует ослабление кишечного барьера, повреждаются ворсинки кишечника, снижается количество бокаловидных клеток, уменьшается выработка муцина, происходит истончение образуемого им защитного слоя, повышается проницаемость кишечника (что иногда описывают термином «дырявый кишечник»). Напомним, что муцин способствует устойчивости к кишечным патогенам, таким как *Campylobacter jejuni* и *Salmonella enterica*, серовар *Typhimurium*. Кроме того, слой муцина важен для бактерий-комменсалов, колонизирующих его, поскольку содержащиеся в нем полисахариды служат источником питательных веществ для бактериальной ферментации, тем самым способствуя целостности кишечника.

Поэтому на фоне истончения кишечника создаются предпосылки для развития инфекционных заболеваний: происходит транслокация (перенос) бактериальных эндотоксинов в кровотока, возникает состояние, называемое эндотоксемией. Эндотоксемия, в свою очередь, приводит к снижению потребления корма и нарушению регуляции промежуточного метаболизма, что вызывает местное и системное воспаление, которое может затронуть прежде всего печень и гипоталамус.

Следующим этапом является уменьшение выработки и активности пищеварительных ферментов, сокращение поедаемости корма, нарушаются процессы всасывания питательных веществ и пищеварения, что приводит к ухудшению продуктивности и падежу.

Ключ к здоровью – кишечник

Ранее стратегии адаптации к воздействию высоких температур включали введение в рацион птицы антиоксидантов и витаминов синтетического происхождения. Тем не менее эффективность некоторых этих мероприятий была противоречивой. Кроме того, синтетические антиоксиданты находятся под пристальным вниманием общественности, ведется напряженная дискуссия о том, что попадание их в продукцию птицеводства может провоцировать онкологические болезни, судороги и другие негативные последствия.

Поскольку именно дисбактериоз кишечника нарушает все ключевые структурные, биохимические и иммунологические элементы кишечного барьера, использование пробиотиков становится одним из важнейших факторов в адаптации к тепловому стрессу. Стратегии противодействия дисбиозу кишечника будут являться решающими для предотвращения нарушения целостности и функций кишечника, а значит, дальнейших тяжелых последствий, спровоцированных перегревом.

Наиболее удачный пример препаратов подобного рода — метапробиотик Пробиоцид-Ультра (НПК «БИОТРОФ»), объединяющий комбинацию естественных бактериальных метаболитов (фумаровой и лимонной кислот) и два штамма *Bacillus* sp., действующих в синергизме. Биопрепарат обеспечивает комплексный подход в борьбе с тепловым стрессом.

Пробиоцид-Ультра не только эффективно стимулирует рост нормофлоры кишечника, выполняя функции классического пробиотика, но и в разы повышает способность подавлять рост патогенных бактерий благодаря подкисляющей способности органических кислот. Поэтому Пробиоцид-Ультра обладает высоким уровнем антимикробной активности в отношении кишечных патогенов *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus cecorum*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и др.

Кроме того, биопрепарат позитивно действует непосредственно на организм хозяина, улучшая физиологию, морфологию и структуру кишечника, активируя работу ферментов, а также нормализуя иммунную функцию, тем самым повышая продуктивность и здоровье птицы, подвергшейся перегреву. Дело в том, что короткоцепочечные жирные кислоты могут окисляться в организме птицы, выступая источником энергии, важной для клеток слизистой оболочки кишечника, что оказывает положительное влияние на морфологию эпителия. В частности, фумаровая кислота как легкодоступный источник энергии имеет сродство к слизистой оболочке тонкого кишечника и усиливает его абсорбционную поверхность за счет быстрого восстановления эпителиальных клеток. Будучи промежуточными звеньями цикла Кребса, фумаровая и лимонная кислоты являются важным субстратом в метаболизме и улучшают адаптационные возможности организма, нормализуя клеточное дыхание.



Рис. 2. Каскадный механизм развития теплового стресса у птицы

Штаммы бактерий в составе биопрепарата Пробиоцид-Ультра влияют на регуляцию потребления корма хозяином посредством различных сигналов, таких как, например, летучие жирные кислоты. Это повышает поедаемость корма птицей, сниженную под воздействием теплового стресса.

Противовоспалительное действие

Как было отмечено, ослабление кишечного барьера на фоне теплового стресса позволяет патогенным бактериям и токсинам легче проникать в организм хозяина. Это сопровождается запуском острой провоспалительной иммунной активности, что выражается в сверхактивации экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Известно, что гиперпродукция провоспалительных генов вовлечена в патогенез целого ряда заболеваний и имеет связь со снижением продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы. Прежде всего провоспалительные цитокины и хемокины вызывают воспали-

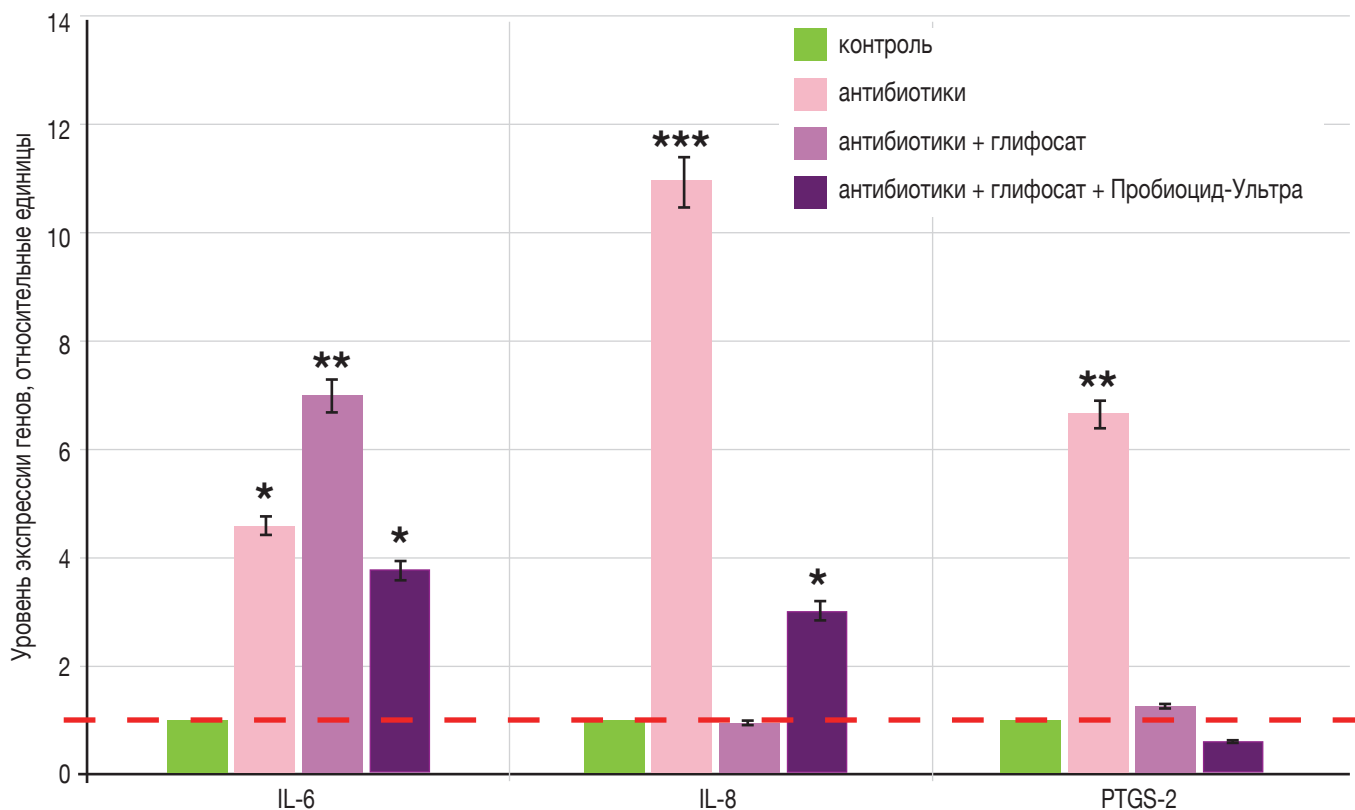


Рис. 3. Уровень экспрессии провоспалительных генов в кишечнике бройлеров в ответ на скормливание антибиотиков, глифосата и пробиотика Пробиоцид-Ультра

* отличия от контрольной группы при $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Прерывистая красная линия показывает уровень экспрессии в контроле, который принят за единицу.

тельную реакцию в кишечнике и печени. Поскольку провоспалительные медиаторы (химические вещества-посредники) печеночного и кишечного происхождения выделяются в кровоток, развивается системное воспаление, которое поражает периферические ткани, такие как скелетные мышцы. В скелетных мышцах провоспалительные цитокины ингибируют синтез белка, одновременно стимулируя разложение белка.

Полезное влияние на птицу пробиотического биопрепарата Пробиоцид-Ультра сводится не только к восстановлению кишечного микробиома. Метапробиотик оказывает влияние на снижение экспрессии провоспалительных генов, таких как IL-6, IL-8 и PTGS-2, — терапевтических мишеней при стрессах, вызванных перегревом, антибиотиками и остаточными пестицидами в кормах (рис. 3).

Специалисты подтверждают

Известно, что тепловой стресс отрицательно сказывается и на эффективности кормовых антибиотиков в птицеводстве.

На одной из крупных бройлерных птицефабрик был проведен эксперимент в промышленном масштабе на бройлерах кросса «Кобб-500»: одна группа получала кормовой антибиотик (нозигептид), из рациона другой группы полностью исключили

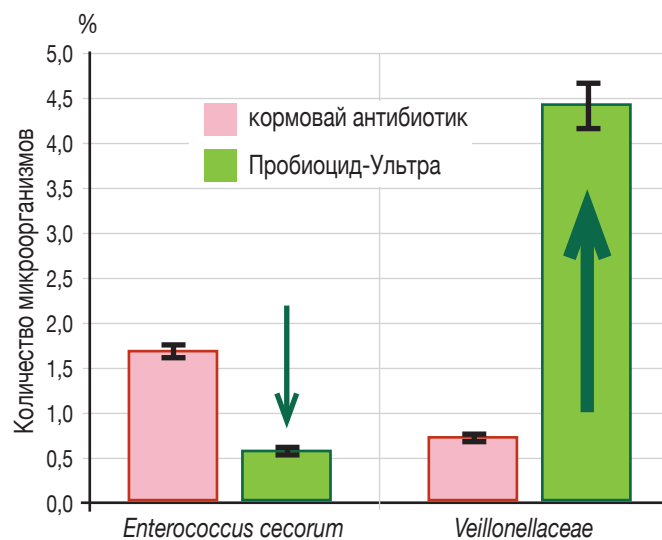


Рис. 4. Содержание микроорганизмов в кишечнике птицы, определенное методом NGS-секвенирования

кормовой антибиотик, заменив его на биопрепарат Пробиоцид-Ультра.

Как показали результаты, полученные с помощью молекулярно-генетического метода NGS-секвенирования, использование биопрепарата Пробиоцид-Ультра оказало выраженное влияние на модуляцию кишечной микробиоты птицы. Так, в кишечнике увеличивалось (в 3,2 раза по сравнению с

нозигептидом) содержание полезных представителей нормобиоты семейства *Veillonellaceae*, которые играют ключевую роль в процессах метаболизма, синтезируя летучие жирные кислоты, в частности бутират, необходимый для восстановления целостности эпителия кишечника, нарушенного стрессами (рис. 4). В то же время Пробиоцид-Ультра снижал содержание патогенов, в том числе опасного для птиц вида *Enterococcus secorum*, с которым не смог справиться даже кормовой антибиотик. *E. secorum* на фоне дисбиозов кишечника способен вызывать различные заболевания опорно-двигательного аппарата, такие как спондилиты, некрозы головки бедренной кости, артриты и остеомиелиты.

Логично, что введение в рацион препарата Пробиоцид-Ультра оказало более выраженное стимулирующее влияние на здоровье и продуктивность бройлеров по сравнению с применением кормового антибиотика, что проявилось в увеличении живой массы и сохранности поголовья (рис. 5). Для сравнения результатов использовали индекс продуктивности, который отражает такие важные показатели, как живая масса, сохранность и затраты кормов, и позволяет комплексно оценить влияние различных факторов на выращивание птицы. В группе с применением биопрепарата индекс продуктивности возрос на 1,41 единицы по сравнению с кормовым антибиотиком.

Комплексное решение

Таким образом, синергическое действие совокупности стрессов в птицеводстве, включая воздействие остаточных количеств пестицидов и, вероятно, других токсикантов кормов, нарушает собственную систему адаптации и не позволяет птице оказывать сопротивление тепловому стрессу. При этом дисбиоз кишечника, вызванный перегревом, играет ключевую роль в нарушении целостности слизистой оболочки кишечника и развитии системного воспаления, которые являются критическими событиями, лежащими в основе снижения продуктивности и здоровья птицы в условиях теплового стресса. Процесс адаптации организма-хозяина к стрессовым условиям должен начинаться с изменений в составе его микробиома.

Стратегии противодействия дисбиозу кишечника имеют решающее значение для смягчения пагубного воздействия перегрева на сельскохозяйственную птицу. Использование метапробиотика Пробиоцид-Ультра позволяет поддерживать гомеостаз микробиома кишечника и сохранить его целостность. Это происходит благодаря стимуляции роста полезных бактерий-комменсалов, ингибированию патогенных микроорганизмов, укреплению кишечного барьера, уменьшению воспалительных процессов и стимуляции кишечного иммунитета, что в конечном итоге способствует увеличению сохранности поголовья и продуктивности птицы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ
22-16-00128

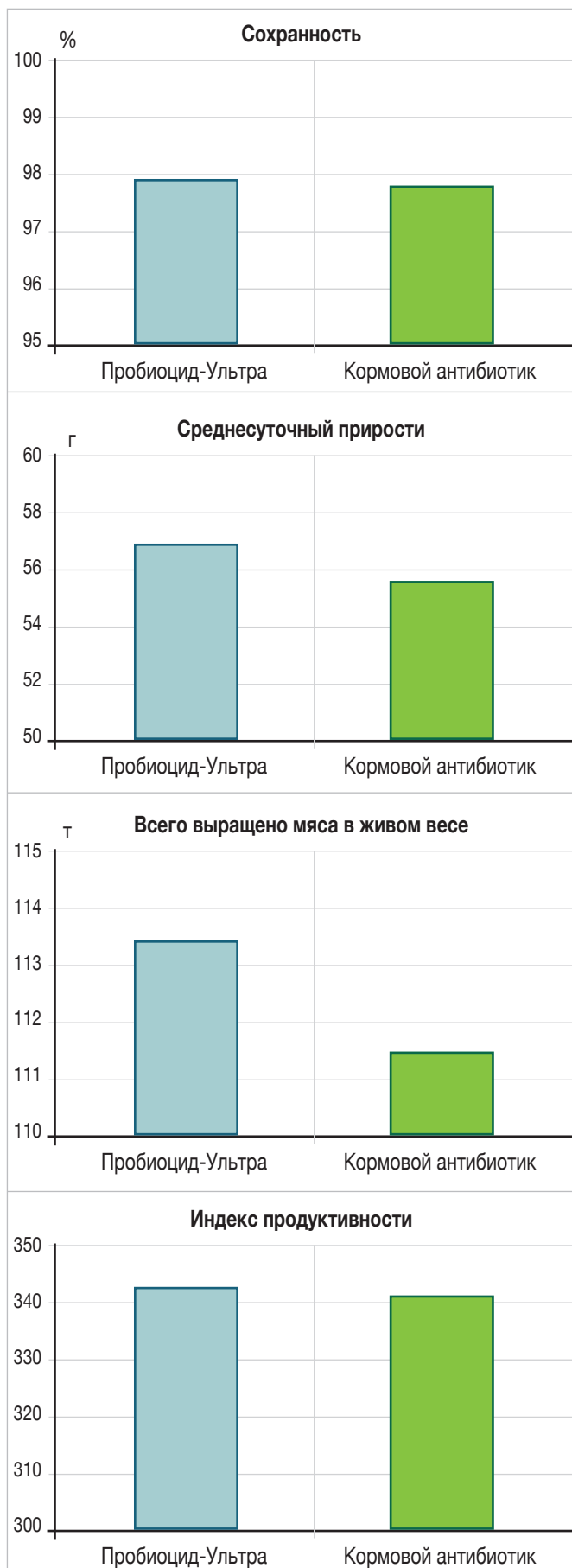


Рис. 5. Сравнительный анализ зоотехнических показателей бройлеров на фоне применения Пробиоцида-Ультра и кормового антибиотика (усредненные данные по двум корпусам)