

ПРИЛОЖЕНИЕ
К отчету по проекту РНФ № 16-16-04032

«Замедление репродуктивного старения кур с помощью культур пробиотических микроорганизмов – продуцентов веществ с антиоксидантной и ДНК-протекторной активностью»

2017 год

Порядок представления результатов совпадает с пунктами раздела «3.2. Ожидаемые в конце 2017 года конкретные научные результаты» отчета за 2016 год

1. Армированные варианты штаммов *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. Данные по их способности вырабатывать ДНК-протекторы и антиоксиданты, а также по антагонистической активности по отношению к патогенным микроорганизмам.

1.1. Выбор модели и индуктора для изучения свойств армированных штаммов.

Задачей данного этапа было изучение биологической активности армированных вариантов штаммов *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. Известно, что для исходных штаммов была характерна антиоксидантная и ДНК-протекторная активность [1], поэтому для армированных вариантов изучались те же свойства. Для этого была подобрана адекватная задаче модель с использованием бактериальных биосенсоров и препаратов-индукторов повреждения ДНК.

Известно, что ДНК-тропные агенты, такие, как противораковые препараты, способны вызывать межцепочечные сшивки, способны приводить к развитию прогероидных синдромов, иначе говоря, к преждевременному старению [2]. Этот эффект проявляется на клеточном и др. уровнях и в комплексе носит название приобретенного преждевременного прогероидного синдрома (acquired premature progeroid syndrome, APPS).

Повреждение ДНК препаратами платины заключается, помимо прочего, в формировании межцепочечных сшивок (МЦС, ICL), что приводит к цитотоксическим эффектам [3,4,5]. МЦС связывают со старением организмов. Одним из основных факторов может быть истощение репликативного потенциала стволовых клеток, клеток-предшественников и нормальных клеток из-за повышенного апоптоза [2].

В наших опытах в качестве индуктора повреждений ДНК, в потенциале ведущих к ускорению старения, мы использовали противораковые препараты «Цисплатин» и «Оксиплат», действующим веществом которых являются цисплатина и оксалиплатин соответственно.

Оксалиплатин (оксиплат) – препарат нового поколения, часто используемый в качестве альтернативы цисплатину. Представляет собой комплекс платины с оксалатом и 1,2-диамино-циклогексаном, обуславливает формирование платиновых внутринитевых «сшивок», что приводит к остановке клеточного цикла и гибели клеток. Биотрансформируется с образованием водных производных, взаимодействующих с ДНК и

нарушающих ее синтез. Побочные эффекты данного препарата менее выражены, чем эффекты цисплатина [6,7].

Действие оксалиплатина сходно с действием цисплатина, однако имеется и ряд важных отличий. Так, имеются данные, что эти препараты по-разному взаимодействуют с системой ММР (мисматч-репарации). Аддукты цисплатина распознаются ею, запуская с-*Abl/p73* путь апоптоза, что обеспечивает цитотоксический эффект цисплатина; аддукты оксалиплатина ею не распознаются, по-видимому, из-за неполярности диаминоциклогексанового кольца [7].

Чтобы изучить генотоксичность двух препаратов на основе платины (цисплатина и оксалиплатина) в простой модельной системе, мы использовали линейку бактериальных биосенсоров на основе *E. coli*, реагирующих на окислительный стресс и повреждения ДНК. Эта методика ранее успешно применялась ранее для изучения прооксидантных и антиоксидантных свойств широкого спектра соединений и препаратов [8], а также для изучения механизмов действия физических факторов [9]. Принципиальная возможность определения генотоксичности препаратов платины в аналогичном тесте была показана нашими коллегами из ГосНИИ Генетика [10].

Эксперименты показали, что препараты платины вызывают у *E. coli* индукцию *RecA*-оперона и *ColD* генов, т.е., запускают механизм SOS-репарации.

На основании экспериментов с биосенсорами были установлены нелетальные и максимально эффективные дозы препаратов.

Методика. В ходе исследований трем курам из контрольной группы в возрасте 19 недель давали корм с повышенным содержанием пробиотика (в дозе 10% от рациона). Давали препарат, основанный на *B. subtilis* КАТМІРА либо на *B. amyloliquefaciens* В1865. Затем из экскрементов птиц на твердой питательной среде МПА были выделены прошедшие через желудочный тракт птицы бактерии – так называемые армированные штаммы *B. subtilis* КАТМІРА и *B. amyloliquefaciens* В1865 соответственно.

Штаммы *Bacillus subtilis* КАТМІРА 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 выращивались в течение суток в жидкой среде LB (Luria-Bertani) в термостате при температуре 37°C. Супернатант, лишенный клеток, был получен путем центрифугирования культуры бацилл (Minispin-plus; Eppendorf, Leipzig, Germany) в течение 7 минут на 6000 оборотах в секунду.

Биосенсорные штаммы *Escherichia coli* MG 1655 pRecA-lux, MG 1655 ColD-lux, MG 1655 pKatG-lux, MG 1655 pSoxS-lux выращивали в течение суток на жидкой среде LB (Luria-Bertani) в термостате при температуре 37°C. Через сутки после посева, культуру разбавляли в пробирке до 0,1 единицы по МакФарланду, затем разбавлялась в 100 раз

средой LB и выдерживали в термостате в течение 2 часов (до ранней экспоненциальной фазы роста культуры). После чего вносили в планшет в количестве 90 мкл на ячейку и измеряли биолюминесценцию, наблюдаемую при повреждении клеток ципрофлоксацином, с помощью люцинометра LM-01T (Immunotech, Praha, Czech Republic).

Результаты. Индукция штамма *E. coli* MG1655 (ColD-lux) цисплатином наблюдалась в диапазоне концентраций 0.005-50мг/мл. Максимальный фактор индукции составил 95.9. Значительной индукции штаммов, реагирующих на окислительный стресс (*E. coli* MG1655 KatG-lux, *E. coli* MG1655 SoxS-lux), не наблюдалось.

Оксалиплатин проявил схожую по характеру активность в биосенсорном тесте с ColD-lux-штаммом (рис. 1), тогда как в тесте с KatG-lux-штаммом его активность была значительно выше, чем у цисплатина (рис. 2).

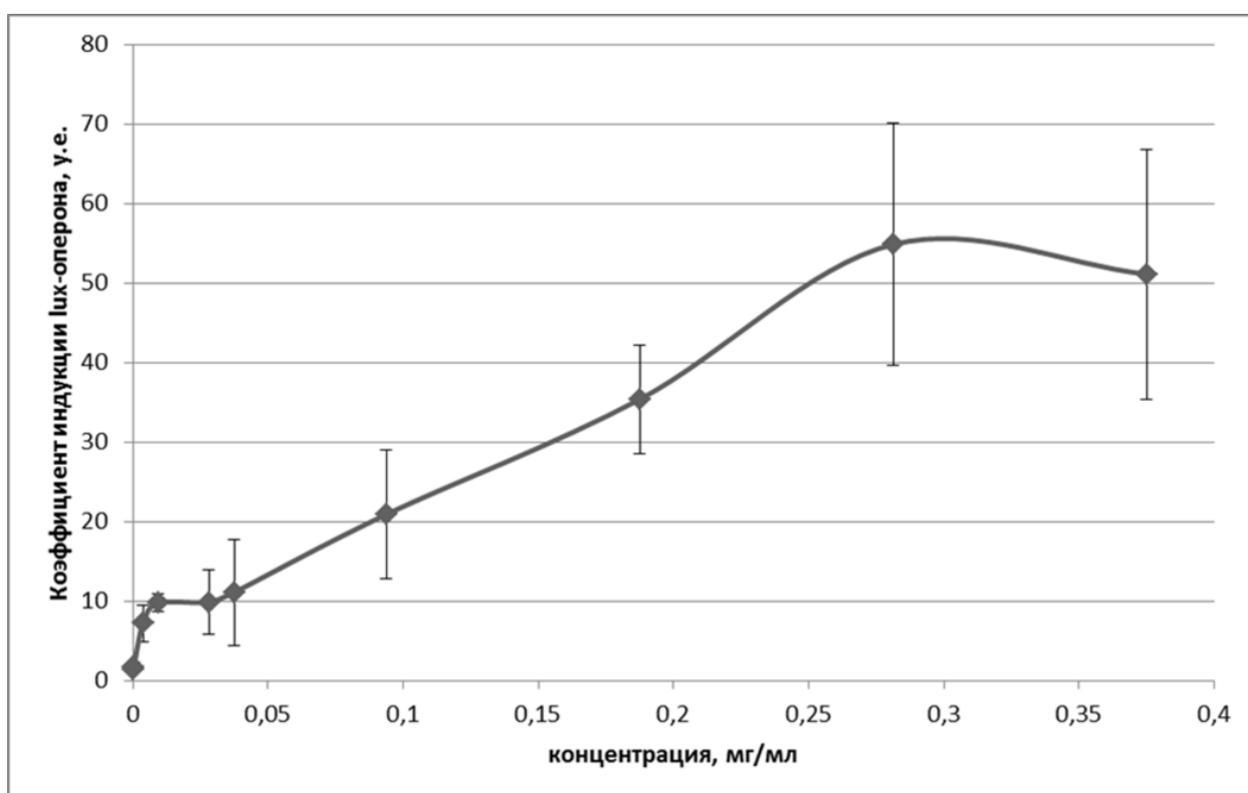


Рис. 1. Индукция штамма *E. coli* MG1655 (ColD-lux) оксалиплатином. Действующие концентрации находились в диапазоне 0.0005-5 мг/мл. Максимальный фактор индукции 54.85.

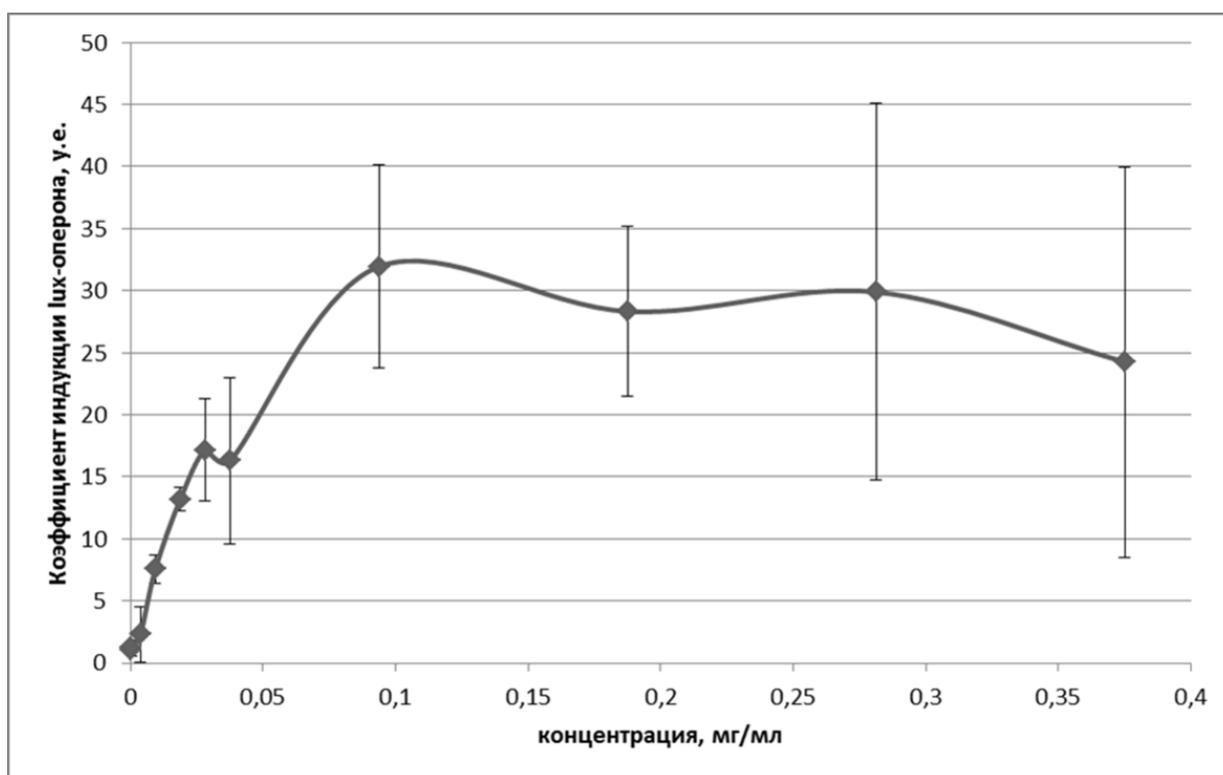


Рис. 2. Индукция штамма *E.coli* MG 1655 (KatG-lux) оксалиплатином. Действующие концентрации находились в диапазоне 0,00001 – 1 мг/мл. Максимальный фактор индукции 31.9.

Последние исследования показывают, что, помимо прямого взаимодействия с ДНК и образования аддуктов, мутагенные и цитотоксические свойства цисплатина могут реализовываться посредством индукции окислительного стресса и генерации активных форм кислорода (АФК), как прямо, так и косвенно [11,12,13]. Это мнение подтверждается, в том числе, и тем фактом, что некоторые антиоксиданты, в частности, аскорбат [14] способны снижать мутагенный потенциал цисплатина.

Препараты платины имеют также мутагенный эффект. Установлено, что подобранные с помощью биосенсорного теста нелетальные для исследованных штаммов дозы данных препаратов вызывают у *E. coli* MG 1655 3--7-кратное увеличение частоты мутантов, устойчивых к антибиотикам [15]

Окислительный стресс играет роль и в реализации эффектов оксалиплатина [12]. Как и в случае с цисплатином, есть данные [16], что природные антиоксиданты силибинин и α -токоферол снижают токсичность препарата.

Как можно видеть из представленных данных, спектр и интенсивность генерации АФК двумя изученными препаратами платины различаются. Цисплатин не демонстрировал активности в опытах с биосенсором, реагирующим на перекись водорода, и проявлял слабую активность в опытах с биосенсором, реагирующим на супероксид-

анион-радикал, тогда как оксалиплатин, напротив, вызывал экспрессию соответствующего оперона KatG-lux-штамма, демонстрируя способность к генерации перекиси водорода. Поскольку именно с генерацией АФК связывают ряд побочных эффектов препаратов, можно предположить, что и побочные эффекты их различаются по механизмам реализации.

Для дальнейших исследований был выбран оксалиплатин как препарат, вызывающий не только генотоксический, но и прооксидантный эффект.

1.2. Изучение протекторных свойств армированных штаммов.

Было установлено, что армированные штаммы штаммов не теряют присущих исходным вариантам ДНК-протекторной и антиоксидантной активностей (табл.1). Значения протекторных эффектов армированных штаммов в большинстве случаев не имеют статистически значимых отличий от таковых для исходных вариантов штаммов

Таблица 1. Протекторная активность армированных штаммов в сравнении с исходными

Штамм	Биосенсор					
	RecA		ColD		SoxS/KatG	
	Максимальная ДНК-протекторная активность, %	Концентрация, в которой наблюдается эффект (объем от исходного ферментата, %)	Максимальная ДНК-протекторная активность, %	Концентрация, в которой наблюдается эффект (объем от исходного ферментата, %)	Антиоксидантная активность, %	Концентрация, в которой наблюдается эффект (объем от исходного ферментата, %)
В1895	28,8±2,3	1	50,5±4,1	0,1	42,8±5,3	1
В1895 армированный	30,8±3,1	1	48,2±4,8	1	49,1±4,5	1
Katmira 1933	27,1±2,9	0,1	67,5±5,7	0,1	60,2±5,9	0,1
Katmira 1933 Армированный	30,3±3,7	0,1	66,7±6,1	0,1	58,3±4,2	0,1

Таким образом, продемонстрированные в опытах ДНК-протекторная и антиоксидантная активности штаммов *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 сохраняются при колонизации данными штаммами кишечника птиц и могут служить основой для защиты от агрессивных факторов среды, ускоряющих старение.

1.3. Изучение антагонистической активности армированных штаммов по отношению к патогенным микроорганизмам.

Для определения антагонистической активности обычных и армированных штаммов бацилл были поставлены опыты с патогенными штаммами видов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius* и р. *Candida*, выделенных у амбулаторных пациентов г. Ростова-на-Дону. Идентификацию штаммов проводили на дифференциально-диагностических питательных средах. Использовали плотную среду Uriselect (Bio-Rad) и среда Эндо для выделения *E. coli*. Среду для выделения стафилококков №10 – для выделения *S. aureus*. *P. gingivalis* выделяли на кровяном агаре, учитывая его способность агглютинировать эритроциты, выделение проводили в анаэробных условиях. *S. intermedius* выделяли на кровяном агаре в анаэробных условиях. Для выделения грибов р. *Candida* использовался хромогенный агар (HiCrome). Штаммы для исследования были любезно предоставлены И.О. Покудиной, ЗАО «Наука», Ростов-на-Дону. Выбор патогенов, выделенных у людей связан с отсутствием инфекционных заболеваний кур на предприятии, выбранном в качестве база проекта. По данным литературы бактерии некоторых вышеназванных видов, таких, как *E. coli*, *S. aureus*, и р. *Candida* могут вызывать болезни и у кур [17,18,19].

Для определения антагонизма применяли метод дисков. Бактерии *B. amyloliquefaciens* В1895 и *B. subtilis* КАТМІРА, обычные и пропущенные через ЖКИ кур – «армированные» - инкубировали на жидкой питательной среде LB в течение двух суток. Затем супернатант очищали от бактерий с помощью фильтрующей насадки Millex, d пор – 0,22 мкм. Беззародышевый супернатант наносили на стерильные диски в объеме 5 мкл, подсушивали и выкладывали на твердую питательную среду, засеянную газоном патогенных бактерий. *E. coli*, *S. aureus* выращивали на среде Луриа-Бертани (LB), грибы р. *Candida* – на среде Сабуро. *P. gingivalis* выращивали на среде Todd-Hewitt broth (ТНВ), *S. intermedius* – на среде Brain Heart Infusion. Аэробов инкубировали при температуре 37°C в течение суток, анаэробов – 5 сут.

Было показано, что бактерии *B. subtilis* КАТМІРА, как обычные, так и армированные бактерии проявляли антагонистическую активность к виду *P. gingivalis* и показывали ширину зоны отсутствия роста 3 мм. Бактерии *B. amyloliquefaciens* В1895 проявляли антагонистическую активность к виду *S. intermedius*, ширина зоны отсутствия роста – 2-3 мм. Разницы между действием обычных и армированных штаммов обнаружено не было. К остальным патогенным штаммом изучаемые бактерии антагонистической активности не проявляли.

2. Нарботка партий препаратов пробиотических штаммов бактерий.

На базе Поволжского научно-исследовательского института производства и переработки мясомолочной продукции в 2016 г был запущен участок производства необходимых для исследования пробиотических препаратов. В 2017 году на данном участке по методике, подробно описанной в отчете за 2016 год, было проведено по 15 выработок препаратов каждого штамма. Выход сухого препарата за одну выработку составил 750+50 г, содержание жизнеспособных клеток использованных штаммов составило 10^9 – 10^{10} КОЕ в одном грамме сухого препарата.

3. Результаты исследования химической природы веществ, обеспечивающих ДНК-протекторную и антиоксидантную активность используемых препаратов.

Для установления химической природы действующего вещества в ферментатах пробиотических бацилл была проведена серия опытов, в которых ферментаты подвергали действию температуры, протеиназы и РНКазы, а затем измеряли их ДНК-протекторную активность на бактериальных биосенсорах.

Методика. Получение ферментата проводилось по методике, описанной в главе 1.

В тестах, в которых предполагалась проверка устойчивости к температуре, супернатант, предварительно выделенный с помощью центрифугирования, разбавляли в 10 и 100 раз и нагревали в течение 5, 15, 30 и 45 минут на водяной бане при 85 градусах Цельсия.

В тесте на биосенсорах, целью которого было проверить влияние протеиназы (Синтол, протеиназа, 10 мг/мкл) на протекторную активность ферментата бацилл, использовали следующие концентрации фермента: без разведения, с разведением в 10, 10 и 1000 раз. То же справедливо и для РНКазы (10 ед/мкл, Синтол).

Результаты. На рис.3 представлены данные о протекторной активности ферментата штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 после воздействия ряда факторов. Для *Bacillus amyloliquifaciens* В-1895 результаты были аналогичны.

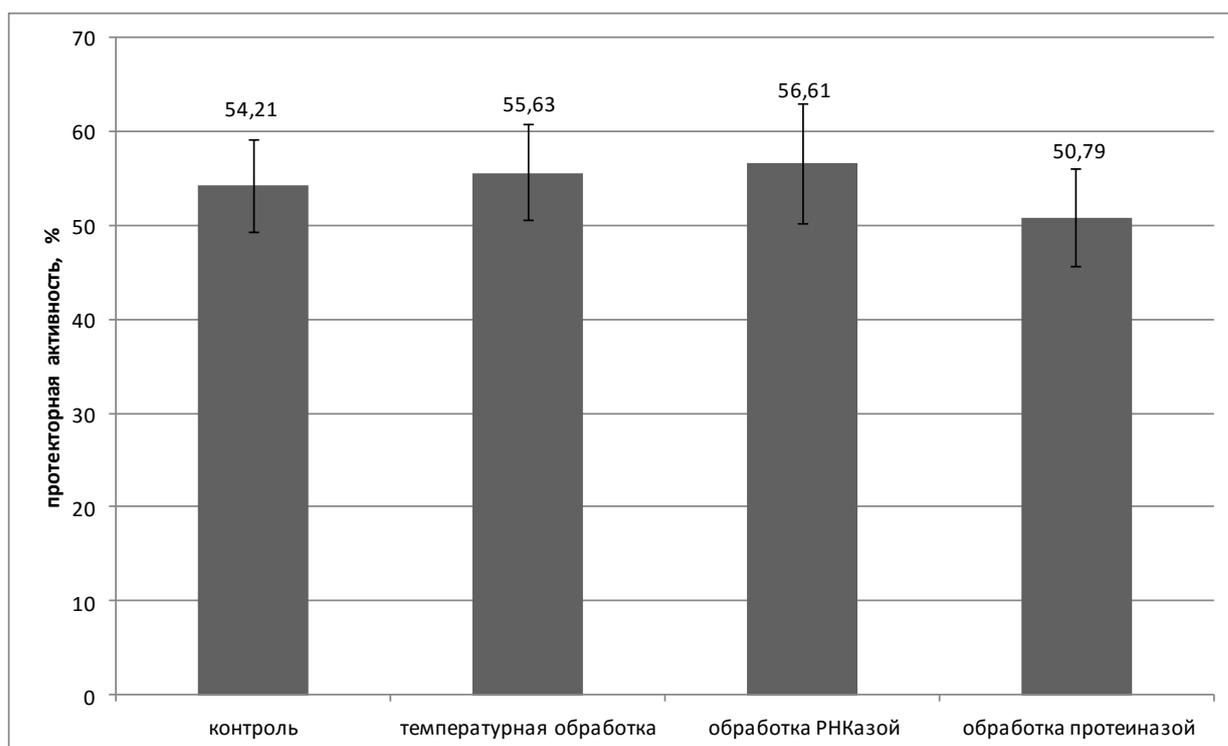


Рис. 3. Действие температуры, протеиназы и РНКазы на ДНК-протекторную активность ферментата бацилл.

Как видно из представленных данных, действующее вещество культуральной жидкости, обладающее целевой активностью, не разрушается под действием температуры, протеиназы и РНКазы. Следовательно, можно заключить, что оно не является сложным белковым соединением либо сигнальной РНК. На основании анализа данных литературы можно предположить, что целевую активность проявляют более короткие и стабильные молекулы, такие, как олигопептиды, являющиеся вторичными метаболитами клеток бацилл [20] либо результатами ферментации субстрата [21].

4. Данные по динамике характеристик и параметров микрофлоры ЖКТ.

Методика. Образцы отбирали в клетках, в которых содержатся опытные и контрольные группы кур и петухов, случайным образом в разных частях клетки, помещали в стерильные контейнеры и при температуре +4°C доставляли в лабораторию.

В лаборатории каждый образец тщательно перемешивали, разводили стерильным физраствором 1:9 по массе, и далее готовили ряд последовательных десятикратных разведений. Дальнейшие исследования вели в строгом соответствии с протоколом, приведенным в методических рекомендациях [22].

Для выделения бактерий р. *Lactobacillus* использовали среду MRS, для выделения р. *Bifidobacterium* использовали селективный агар для выделения бифидобактерий, для

выделения бактерий р. *E.coli* и других колиформ использовали среду Эндо, для выделения р. *Enterococcus* – Желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, р. *Stapylococcus* – среду №10, бактерий р. *Salmonella* и *Shigella* – селективный SS-агар. Бактерии р. *Bacillus* выделялись на среде МПА.

Данные по микрофлоре ЖКТ птиц представлены в таблице 2.

Таблица 2. Микробиологический состав помёта птиц

Дата отбора проб	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
<i>Lactobacillus</i>, 10⁷ КОЕ/г				
14.02.17	1,4±0,3	1,3±0,4	1,1±0,2	1,4±0,3
16.05.17	1,0±0,2	1,2±0,3	1,2±0,3	1,3±0,3
22.08.17	0,9±0,3	1,1±0,3	1,0±0,3	0,9±0,1
15.11.17	1,4±0,4	1,3±0,2	0,9±0,3	1,3±0,1
<i>E.coli</i> и колиформы, 10⁷ КОЕ/г				
14.02.17	5,6±1,2	6,4±0,7	7,2±1,0	7,0±1,0
16.05.17	5,1±1,1	5,5±1,5	4,7±0,9	6,2±1,3
22.08.17	7,8±0,9	4,4±1,1	6,7±1,2	7,9±1,4
15.11.17	5,9±1,3	6,3±0,9	7,1±1,1	5,5±1,2
<i>Enterococcus</i>, 10⁶ КОЕ/г				
14.02.17	1,7±0,7	1,6±0,9	2,2±0,4	1,9±0,5
16.05.17	1,2±0,6	2,3±0,6	1,4±0,5	0,9±0,4
22.08.17	2,0±0,9	1,9±0,5	1,6±0,6	1,7±0,3
15.11.17	1,9±0,4	2,3±0,6	1,7±0,5	2,1±0,6
<i>Stapylococcus</i>, 10⁶ КОЕ/г				
14.02.17	3,3±0,6	3,8±0,4	1,8±0,6	3,4±0,6
16.05.17	2,2±0,5	3,4±0,7	3,3±0,4	2,8±0,7
22.08.17	2,9±0,5	2,8±0,4	2,9±0,5	3,3±0,4
15.11.17	3,5±0,8	1,9±0,5	1,8±0,4	3,2±0,5
<i>Bifidobacterium</i>, КОЕ/г				
14.02.17	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶
16.05.17	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶
22.08.17	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶
15.11.17	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶

Бактерий р. *Salmonella* и *Shigella* ни в одной пробе за все время исследования обнаружено не было.

Бактерии р. *Bacillus* не выделялись из исследованных образцов.

Мониторинг микрофлоры птиц показал, что после достижения ими полового созревания и стабильной массы микрофлора птиц так же стабилизировалась. Достоверных отличий между группами, как и тенденций к изменению параметров, отмечено не было. Внесение в рацион пробиотика не оказало негативного действия на микрофлору птиц.

5. Осуществление индивидуального мечения птиц.

В возрасте 15 недель подопытная птица, при переводе в цех родительского стада, была окольцована индивидуальными ножными бирками для более четкого учета за развитием и продуктивностью.

6. Данные мониторинга физиологического состояния птиц, включая параметры яйценоскости и качества спермы, стабильности ДНК и длины теломер групп кур, получающих стандартный корм и корм, обогащенный пробиотическими препаратами. Статистические характеристики взаимосвязи стабильности ДНК и длины теломерных участков хромосом.

6.1. Мониторинг физиологических параметров опытных и контрольной групп птиц, включая параметры яйценоскости и качества спермы.

Экспериментальные исследования по данной теме проводятся в условиях СП «Светлый», являющимся структурной единицей ЗАО «Агрофирма «Восток».

Для опыта были сформированы 8 групп суточных цыплят родительского стада кросса «Хайсекс браун» (вывод 25.08.2016 г.), полученных из ООО ППР «Свердловский»: 4 группы курочек по 70 голов и 4 группы петушков по 7 голов в каждой. В возрасте 13, 17 и 21 неделя была проведена анатомическая разделка птицы и с 19.01.2017 г курочек в подопытных группах осталось по 61 голове, петушков – по 4 (табл. 3).

Таблица 3. Схема исследований

Группа	n	Условия кормления
Курочки		
Контрольная	61	ОР
I опытная	61	ОР+добавка №1
II опытная	61	ОР+добавка №2
III опытная	61	ОР+добавка №1,2
Петушки		
Контрольная	4	ОР
I опытная	4	ОР+добавка №1
II опытная	4	ОР+добавка №2
III опытная	4	ОР+добавка №1,2

Добавка №1 включает в себя пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus subtilis* КАТМІРА 1933, в качестве наполнителя экструдированный тыквенный жмых.

Добавка №2 – пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895, в качестве наполнителя экструдированный тыквенный жмых.

Добавка №3 – пробиотический препарат на основе *Bacillus subtilis* КАТМІРА1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 в равных долях, в качестве наполнителя - экструдированный тыквенный жмых.

Дозы введения препаратов отработаны ранее, которые составляют 1% в структуре рациона.

Подопытная птица содержится в клеточных батареях Big Dutchman (Германия). Кормление осуществлялось стандартным комбикормом, изготовленным на комбикормовом заводе предприятия. Кормление подопытной птицы проводилось согласно нормам кормления сельскохозяйственных животных, разработанным Калашниковым и др. [23].

Мониторинг состояния птицы

Постановка научно-хозяйственного эксперимента проводилась с использованием следующих методик: «Основы опытного дела» [24, 25, 26]

Анализ гематологического и биохимического составов крови подопытной птицы проводили в строгом соответствии с методическими указаниями [27, 28].

Мониторинг физиологических параметров опытных и контрольной групп птиц

К началу яйцекладки птица всех подопытных групп набрала нормативную живую массу, однако, как курочки, так и петушки превышали живую массу птиц контрольной группы (табл.4). Развитие репродуктивных органов ремонтного молодняка также находилось в пределах нормативных показателей для данного кросса птицы (табл. 5).

Таблица 4. Развитие репродуктивных органов ремонтного молодняка (курочки, петушки) (n=3)

Группа	Возраст, недель	курочки			петушки	Возраст снесения первого яйца, дней
		длина яйцевода, см	масса, г			
			яйцевода	яичника	семенников	
контрольная	13	5,9±0,06	0,55±0,04	0,80±0,09	0,48±0,06	127
	17	26,9±0,14	10,70±0,15	1,10±0,11	18,73±0,21	
	21	60,7±0,21	50,30±0,26	41,30±0,46	38,07±0,27	
I опытная	13	6,6±0,08*	0,70±0,08	0,90±0,07	0,64±0,07	128
	17	29,3±0,18*	12,80±0,23*	1,30±0,13	19,03±0,18	

	21	63,8±0,17**	54,60±0,29**	45,31±0,51*	41,24±0,33*	
II опытная	13	6,5±0,07*	0,70±0,08	0,80±0,09	0,59±0,05	126
	17	28,4±0,11*	11,60±0,32	1,20±0,15	18,84±0,19	
	21	63,5±0,31*	53,80±0,38*	45,18±0,44*	40,76±0,39*	
III опытная	13	6,2±0,05	0,60±0,06	0,80±0,08	0,58±0,09	126
	17	28,9±0,19*	12,10±0,19*	1,30±0,12	19,27±0,26	
	21	63,6±0,34*	54,20±0,41*	45,35±0,57*	41,69±0,42*	

Здесь и далее: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 (t-тест)

Изучение развития репродуктивных органов ремонтных молодых показало, что увеличение массы яичника наблюдалось после 17-недельного возраста и объясняется началом созревания фолликул перед яйцекладкой. Масса яичника ремонтных молодых опытных групп к 21-недельному возрасту превышала контроль на 9,7 (P<0,05), 9,4 (P<0,05) и 9,8% (P<0,05). При достижении молодыми физиологической зрелости наблюдалось резкое увеличение, как длины яйцевода, так и его массы. Длина яйцевода у молодых опытных групп оказалось выше, чем в контрольной на 3,1 (P<0,01), 2,8 (P<0,05) и 2,9 см (P<0,05), а его масса - на 4,3 (P<0,01), 3,5 (P<0,05) и 3,9 г (P<0,05).

Различия в развитии репродуктивных органов, обнаруженные в процессе выращивания ремонтных молодых подопытных групп, повлияли на возраст снесения первого яйца. Во II и III опытных группах первое яйцо было получено в возрасте 126 дней, в контрольной группе – в 127 дней, а в I опытной группе – в 128 дней.

Развитие внутренних органов ремонтного молодняка в возрастном аспекте находилось на уровне физиологической нормы. Однако масса внутренних органов (сердце, печень, мышечный желудок, легкие и селезенки), как курочек, так и петушков опытных групп превышала контроль. Наиболее значительная разница по изучаемым показателям наблюдалась между I опытной группой и контролем (табл. 5).

Таблица 5. Развитие внутренних органов подопытной птицы, г (n=3)

Показатель	Пол	Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Возраст 13 недель					
Живая масса	кур	991±13,29	1073±14,18**	1011±11,89*	974±10,53
	пет	1220±14,89	1525±18,11**	1430±19,35**	1420±1

					8,67**
Масса сердца	кур	4,40±0,19	5,63±0,21*	5,11±0,15*	4,65±0,17
	пет	6,25±0,27	8,21±0,34**	7,40±0,36*	7,37±0,19*
Масса печени	кур	20,33±1,04	27,00±1,09*	24,33±0,87	22,00±0,93
	пет	31,06±1,09	39,84±1,13*	36,69±1,06*	36,15±1,15*
Масса мышечного желудка	кур	24,00±0,81	29,33±0,95*	27,00±0,77	25,33±0,54
	пет	36,08±1,19	45,82±1,24**	42,60±1,31*	42,14±1,28*
Масса легких	кур	4,67±0,14	5,33±0,19	5,07±0,15	4,90±0,24
	пет	6,28±0,19	7,88±0,24**	7,24±0,17*	7,16±0,21*
Масса селезенки	кур	1,98±0,17	2,20±0,21	2,10±0,15	2,00±0,19
	пет	2,84±0,31	5,08±0,43**	4,48±0,29**	4,42±0,33**
Возраст 17 недель					
Живая масса	кур	1497±8,15	1642±10,72**	1613±9,14*	1589±10,18*
	пет	2038±9,11	2153±11,45*	2119±10,67*	2094±9,17*
Масса сердца	кур	7,23±0,13	8,53±0,16*	8,06±0,21	7,95±0,18
	пет	9,19±0,23	10,98±0,27*	10,59±0,19*	10,68±0,21*
Масса печени	кур	32,68±0,96	40,72±0,89*	39,84±1,04*	39,25±0,77
	пет	49,15±1,09	56,49±1,11*	55,09±1,05*	55,44±1,13
Масса мышечного желудка	кур	36,23±0,67	44,33±0,91*	44,03±0,87*	43,66±0,59*
	пет	60,32±1,15	64,59±1,31	63,57±1,27	62,82±1,19
Масса легких	кур	7,04±0,11	8,21±0,13*	8,07±0,24	7,78±0,17
	пет	10,39±0,18	11,19±0,21	11,02±0,17	10,88±0,14
Масса селезенки	кур	3,99±0,77	4,28±0,34	4,23±0,31	4,18±0,29
	пет	6,11±0,17	6,67±0,26	6,57±0,25	6,49±0,33
Возраст 21 неделя					
Живая масса	кур	1783±10,26	1870±12,44*	1857±12,59*	1821±11,17
	пет	2435±11,23	2512±13,17*	2504±10,99*	2473±13,48

Масса сердца	кур	8,56±0,15	9,72±0,17*	9,47±0,21*	9,23±0,19
	пет	11,20±0,16	12,81±0,14*	12,77±0,17*	12,61±0,12*
Масса печени	кур	39,22±0,84	46,38±0,91*	46,05±0,79*	45,16±0,63*
	пет	58,68±1,03	65,56±1,14*	65,35±1,08*	64,79±0,92*
Масса мышечного желудка	кур	43,15±1,11	50,49±1,21*	50,14±1,13*	49,17±1,09
	пет	68,07±0,97	74,35±1,12*	74,12±1,04*	73,20±0,93
Масса легких	кур	8,38±0,11	9,35±0,14*	9,29±0,12*	9,11±0,09*
	пет	12,42±0,15	13,26±0,13*	13,22±0,16	12,86±0,11
Масса селезенки	кур	4,81±0,19	5,05±0,21	5,01±0,43	4,92±0,32
	пет	7,31±0,25	7,78±0,37	7,75±0,29	7,67±0,33

Нельзя не учитывать тот факт, что живая масса птиц опытных групп превышала контроль, что отразилось и на развитии внутренних органов. Однако достоверная разница по массе внутренних органов птиц между опытными группами и контролем убедительно доказывает, что изучаемые добавки оказали положительное влияние на рост птиц и развитие внутренних органов.

Во время проведения ветеринарно-санитарной экспертизы при убойе подопытной птицы было установлено, что сердце, легкие, почки, печень, селезенка, желудок и кишечник не имели каких-либо патологических изменений, связанных со скормливанием изучаемых добавок.

Гематологические показатели и биохимический состав крови подопытной птицы находились на уровне нормативных показателей (табл. 6, 7).

Во все изучаемые возрастные периоды содержание гемоглобина в крови ремонтного молодняка опытных групп, как курочек, так и петушков превышала контроль. Так, у курочек опытных групп в возрасте 13 недель содержание гемоглобина в крови оказалось выше контроля на 13,64 (P<0,05), 13,14 (P<0,05) и 12,88% (P<0,05), в возрасте 17 недель – на 16,23 (P<0,01), 14,39 (P<0,05) и 13,83% (P<0,05), в возрасте 21 недели – на 15,17 (P<0,01), 14,12 (P<0,01) и 13,50% (P<0,05); у петухов в возрасте 13 недель – на 9,03 (P<0,05), 8,18 (P<0,05) и 8,11% (P<0,05), в возрасте 17 недель – на 8,18 (P<0,05), 7,34 (P<0,05) и 7,36% (P<0,05), в возрасте 21 недели – на 12,86 (P<0,05), 11,59 (P<0,05) и 11,48% (P<0,05).

Таблица 6. Гематологические показатели ремонтного молодняка (n=3)

Показатель	Пол	Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Возраст 13 недель					
Эритроциты, 10 ¹² /л	кур	3,06±0,03	3,19±0,05	3,17±0,04	3,16±0,06
	пет	2,94±0,04	3,11±0,06	3,11±0,08	3,09±0,07
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	кур	29,67±0,39	30,48±0,44	30,07±0,31	30,17±0,54
	пет	29,73±0,41	30,14±0,61	30,21±0,57	29,96±0,73
Гемоглобин, г/л	кур	118,61±1,24	134,79±2,04*	134,20±1,99*	133,89±1,64*
	пет	111,33±1,71	121,38±1,65*	120,44±1,17*	120,36±1,21*
Возраст 17 недель					
Эритроциты, 10 ¹² /л	кур	3,11±0,05	3,39±0,04*	3,34±0,03	3,29±0,06
	пет	3,05±0,06	3,17±0,05	3,15±0,04	3,12±0,05
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	кур	29,73±0,21	30,63±0,37	30,49±0,42	30,27±0,49
	пет	29,75±0,26	30,21±0,17	30,15±0,62	30,14±0,32
Гемоглобин, г/л	кур	120,31±1,21	139,84±1,43**	137,63±1,67*	136,95±1,53*
	пет	145,43±1,17	157,32±1,22*	156,11±1,36*	156,13±1,26*
Возраст 21 неделя					
Эритроциты, 10 ¹² /л	кур	3,15±0,04	3,48±0,05*	3,45±0,03*	3,38±0,04
	пет	3,09±0,07	3,24±0,06	3,21±0,05	3,16±0,07
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	кур	29,81±0,33	30,74±0,48	30,56±0,51	30,45±0,41
	пет	29,79±0,66	30,19±0,57	30,21±0,47	30,17±0,39
Гемоглобин, г/л	кур	122,65±1,23	141,25±1,19**	139,97±1,26**	139,21±1,32*
	пет	207,17±1,99	233,81±2,33*	231,69±2,18*	230,95±1,67*

В возрасте 17 недель у курочек I опытной группы достоверно повысилось содержание эритроцитов в крови на 9,00% (P<0,05). В возрасте 21 недели у курочек I и II опытных групп содержание эритроцитов превышало контроль на 10,48 (P<0,05) и 9,52% (P<0,05).

Различия в составе крови наблюдаются не во всех случаях применения пробиотиков у птиц. При кормлении птиц бактериями р. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* не отмечалось достоверных изменений состава крови [29, 30]. С другой стороны, при кормлении птиц бактериями р. *Vacillus* отмечается увеличение количества эритроцитов, гемоглобина и т.д. [31, 32, 33]. Это объясняется стимулирующим действием пробиотических добавок с бактериями р. *Vacillus* на органы гемопоэза.

Уровень общего белка в сыворотке крови ремонтных молодых и петухов опытных групп превышал контроль на протяжении всего изучаемого периода. Аналогичная картина наблюдается и по уровню альбуминов в сыворотке крови птиц опытных групп.

Таблица 7. Биохимический состав крови ремонтного молодняка (n=3)

Показатель	Пол	Группа
------------	-----	--------

		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Возраст 13 недель					
Общий белок, г/л	кур	52,94±0,36	56,19±0,27*	55,99±0,43*	55,87±0,29*
	пет	54,04±0,29	57,43±0,42*	57,14±0,21*	57,03±0,34*
Альбумины, г/л	кур	21,29±0,17	23,55±0,16*	23,42±0,13*	23,36±0,18*
	пет	22,22±0,13	25,24±0,15**	25,04±0,17*	24,75±0,09*
Относительные, %	кур	40,22±0,48	41,91±0,36	41,82±0,53	41,82±0,61
	пет	41,11±0,74	43,95±0,57	43,82±0,37	43,39±0,81
Глобулины, г/л	кур	31,65±1,07	32,64±1,13	32,57±1,15	32,51±1,09
	пет	31,82±1,19	32,19±1,24	32,38±1,17	32,28±1,49
Относительные, %	кур	59,78±2,13	58,09±1,92	58,18±2,79	58,18±2,11
	пет	58,89±1,19	56,05±2,58	56,18±3,04	56,61±2,49
Белковый индекс	кур	0,67	0,72	0,72	0,72
	пет	0,70	0,78	0,77	0,77
Мочевина, ммоль/л	кур	3,28±0,07	3,96±0,08*	3,91±0,06*	3,75±0,05*
	пет	3,36±0,05	3,99±0,06*	3,95±0,07*	3,94±0,08*
Глюкоза, ммоль/л	кур	7,61±0,07	8,49±0,08*	8,44±0,07*	8,41±0,09*
	пет	7,56±0,08	8,48±0,07*	8,41±0,06*	8,37±0,05*
Возраст 17 недель					
Общий белок, г/л	кур	53,24±0,27	57,73±0,32**	57,21±0,19**	56,83±0,24**
	пет	55,18±0,17	59,37±0,35**	59,11±0,42*	58,65±0,37*
Альбумины, г/л	кур	21,47±0,13	24,37±0,11**	24,05±0,16**	23,79±0,15**
	пет	22,89±0,15	26,21±0,19**	26,01±0,21**	25,71±0,18**
Относительные, %	кур	40,83±0,39	42,17±0,27	42,03±0,43	41,87±0,51
	пет	41,49±0,51	44,15±0,38	44,01±0,61	43,84±0,47
Глобулины, г/л	кур	31,77±0,94	33,42±0,97	33,16±1,09	33,04±0,84
	пет	32,29±1,07	33,16±0,81	33,10±0,75	32,94±0,68
Относительные, %	кур	59,67±1,64	57,83±1,18	57,97±2,43	58,13±2,13
	пет	58,51±1,41	55,85±2,19	55,99±3,12	56,16±2,87
Белковый индекс	кур	0,68	0,73	0,73	0,72
	пет	0,71	0,79	0,79	0,78
Мочевина ммоль/л	кур	3,31±0,07	3,99±0,05*	3,97±0,06*	3,97±0,07*
	пет	3,39±0,08	4,17±0,06*	4,15±0,05*	4,15±0,05*
Глюкоза, ммоль/л	кур	7,63±0,06	8,41±0,08*	8,39±0,07*	8,35±0,06*
	пет	7,59±0,05	8,39±0,07*	8,38±0,06*	8,36±0,08*
Возраст 21 неделя					
Общий белок, г/л	кур	54,57±0,31	59,64±0,23**	59,37±0,29**	58,79±0,34*
	пет	55,77±0,24	60,59±0,19**	60,13±0,13**	58,87±0,29**
Альбумины, г/л	кур	22,16±0,23	25,69±0,24**	25,54±0,19**	25,19±0,25*
	пет	23,28±0,17	26,85±0,22**	26,49±0,16**	26,16±0,19**
Относительные, %	кур	40,61±0,52	43,07±0,49	43,01±0,68	42,85±0,72
	пет	41,76±0,48	44,31±0,57	44,05±0,63	43,69±0,54
Глобулины, г/л	кур	32,41±0,75	33,95±0,91	33,83±0,77	33,60±0,78
	пет	32,49±0,95	33,74±0,63	33,64±0,49	33,71±0,54
Относительные, %	кур	59,39±1,32	56,93±1,12	56,99±1,27	57,15±1,18
	пет	58,24±2,46	55,69±1,44	55,95±2,39	56,31±3,18
Белковый индекс	кур	0,68	0,77	0,76	0,75
	пет	0,72	0,80	0,79	0,78

Мочевина ммоль/л	кур	3,39±0,07	4,12±0,06*	4,09±0,08*	4,02±0,05*
	пет	3,46±0,09	4,27±0,05*	4,22±0,06*	4,21±0,08*
Глюкоза, ммоль/л	кур	7,59±0,06	8,42±0,07*	8,42±0,05*	8,39±0,05*
	пет	7,51±0,08	8,11±0,07*	8,11±0,06*	8,07±0,07*

Содержание альбуминов в сыворотке крови кур опытных групп в возрасте 13 недель превышала контроль на 10,62 (P<0,05), 10,01 (P<0,01) и 9,72% (P<0,05), в возрасте 17 недель – на 13,51 (P<0,01), 12,02 (P<0,01) и 10,81% (P<0,01), в возрасте 21 недели – на 15,93 (P<0,01), 15,25 (P<0,01) и 13,67% (P<0,05); у петушков в возрасте 13 недель – на 13,59 (P<0,01), 12,69 (P<0,01) и 11,38% (P<0,01), в возрасте 17 недель – на 14,50 (P<0,01), 13,63 (P<0,01) и 12,32% (P<0,01), в возрасте 21 недели – на 15,34 (P<0,01), 13,79 (P<0,01) и 12,37% (P<0,01).

Содержание мочевины в сыворотке крови птиц, получавших изучаемые добавки увеличилось по отношению к контролю: у кур в возрасте 13 недель на 20,73 (P<0,05), 19,21 (P<0,05) и 14,33% (P<0,05), в возрасте 17 недель – на 20,54 (P<0,05) и 19,94% (P<0,05), в возрасте 21 недели – на 21,53 (P<0,05), 20,65 (P<0,05) и 18,58% (P<0,05).

У петухов в возрасте 13 недель содержание мочевины в сыворотке крови также было выше контроля на 18,75 (P<0,05), 17,56 (P<0,05) и 17,26% (P<0,05), в возрасте 17 недель – на 23,01 (P<0,05) и 22,42% (P<0,05), в возрасте 21 недели – на 23,41 (P<0,05), 21,96 (P<0,05) и 21,68% (P<0,05).

Уровень глюкозы в сыворотке крови птиц во все возрастные периоды находился выше контроля.

Приведённые выше данные могут косвенно свидетельствовать о положительном влиянии пробиотиков на интенсивность обмена веществ в организме опытных птиц.

Изучаемые препараты оказали умеренно стимулирующее влияние на обмен кальция и фосфора в сыворотке крови кур и петухов родительского стада (табл. 8).

Таблица 8. Содержание кальция и фосфора в сыворотке крови кур и петухов подопытных групп (n=3)

Группа	Возраст, недель	куры		петухи	
		кальций, ммоль/л	фосфор, ммоль/л	кальций, ммоль/л	фосфор, ммоль/л
контрольная	13	2,59±0,13	1,61±0,08	2,74±0,13	1,57±0,07
	17	2,92±0,15	1,73±0,06	2,90±0,12	1,68±0,09
	21	5,11±0,18	1,68±0,04	3,02±0,15	1,66±0,05
I опытная	13	2,68±0,09	1,69±0,05	3,15±0,09	1,76±0,04
	17	3,19±0,17	1,75±0,07	3,04±0,08	1,87±0,07
	21	5,47±0,21	1,64±0,09	3,08±0,14	1,68±0,04
II опытная	13	2,73±0,11	1,67±0,04	2,88±0,11	1,69±0,03
	17	3,17±0,12	1,78±0,05	2,86±0,17	1,75±0,05
	21	5,32±0,24	1,68±0,03	3,07±0,12	1,63±0,04

III опытная	13	2,69±0,12	1,59±0,06	2,83±0,13	1,65±0,05
	17	3,21±0,15	1,71±0,05	2,79±0,12	1,71±0,06
	21	5,38±0,19	1,64±0,03	3,02±0,15	1,62±0,05

Результаты исследований показали, что содержание кальция и фосфора изменялось как в возрастном аспекте, так и в разрезе групп, однако их значения находились в пределах физиологических норм.

При достижении ремонтными молодками возраста 21-недели содержание кальция в сыворотке крови подопытных групп достигло 5,11-5,47%. Если сравнивать уровень содержания кальция в крови кур опытных групп с контрольной, то наблюдается тенденция к увеличению на 7,05; 4,11 и 5,28% соответственно, однако полученные данные статистически недостоверны.

Содержание фосфора в сыворотке крови кур опытных групп стабильное и находится на уровне контроля. Соотношение Ca/P варьирует в пределах 3,0/1,0, что соответствует физиологической норме.

Повышение уровня кальция в крови в предкладковый период и во время яйцекладки следует рассматривать не как фактор интенсификации кальциевого обмена, а как фактор, обеспечивающий транспортировку запасных продуктов для синтеза протеинов яичного желтка и образование скорлупы.

Мониторинг качества спермы птиц

Оценка качественных показателей спермы – это определение комплекса физиологических свойств, характеризующих биологическую полноценность, от которой зависит ее оплодотворяющая способность. Наиболее полно и объективно об оплодотворяющей способности спермы самцов птицы можно судить по результатам осеменения, то есть по проценту оплодотворенных яиц от общего числа инкубационных [34].

В наших исследованиях по изучению влияния изучаемых добавок на состояние спермопродукции у племенных петухов установлено, что самцы опытных групп превосходили контрольную по объему эякулята на 12,00; 6,00 и 8,00%, концентрации спермиев в эякуляте – на 28,52 (P<0,01); 17,58 (P<0,05) и 23,83% (P<0,01) и общему числу спермиев в эякуляте – на 17,49 (P<0,05); 8,05 и 13,42% (табл. 9).

Таблица 9. Качество спермопродукции петухов (n=5)

Показатель	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Цвет	белый	белый	белый	белый
Объем эякулята, мл	0,50±0,04	0,56±0,03	0,53±0,04	0,54±0,05
Общее количество	1,49±0,05	1,75±0,06*	1,61±0,04	1,69±0,06

сперматозоидов в эякуляте, млрд.				
Концентрация спермиев, млрд./мл	2,56±0,08	3,29±0,07**	3,01±0,09*	3,17±0,09**
Количество морфологически аномальных половых клеток в эякуляте, %	14,7±0,40	10,4±0,51**	11,7±0,43**	10,1±0,62**

Количество морфологически аномальных клеток в эякуляте петухов опытных групп снизилось на 41,35 (P<0,01); 25,64 (P<0,01) и 45,55% (P<0,01).

Результаты исследований аминокислотного состава спермопродукции подопытных петухов (лаборатория ФГБНУ «ВНИИМП» (г. Москва), НД на метод: МВИ-02-2002) показали, что содержание аминокислот спермы петухов опытных групп оказалось выше, чем в контроле (табл. 10).

Таблица 10. Содержание аминокислот в сперме петухов, г/100 г (n=3)

	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Аспарагиновая кислота	0,130±0,004	0,153±0,003*	0,135±0,005	0,128±0,004
Глутаминовая кислота	0,169±0,005	0,208±0,004*	0,194±0,006	0,169±0,005
Серин	0,143±0,005	0,180±0,006*	0,159±0,004	0,150±0,006
Гистидин	0,040±0,007	0,038±0,005	0,029±0,003	0,037±0,008
Глицин	0,038±0,006	0,047±0,007	0,041±0,008	0,040±0,006
Треонин	0,108±0,005	0,142±0,006*	0,115±0,006	0,108±0,005
Аргинин	0,154±0,016	0,190±0,004*	0,169±0,007	0,163±0,004
Аланин	0,119±0,007	0,156±0,005*	0,134±0,006	0,114±0,007
Тирозин	0,069±0,003	0,090±0,004	0,075±0,005	0,068±0,004
Цистин	0,033±0,006	0,033±0,005	0,031±0,006	0,035±0,006
Валин	0,040±0,007	0,052±0,006	0,042±0,008	0,042±0,007
Метионин	0,023±0,005	0,027±0,008	0,025±0,006	0,024±0,005
Фенилаланин	0,032±0,006	0,042±0,004	0,033±0,003	0,034±0,005
Изолейцин	0,022±0,005	0,030±0,006	0,023±0,007	0,022±0,006
Лейцин	0,058±0,007	0,077±0,005	0,060±0,004	0,060±0,008
Лизин	0,056±0,004	0,068±0,006	0,058±0,005	0,057±0,004
Пролин	0,027±0,006	0,027±0,005	0,026±0,007	0,025±0,005
Всего	1,260±0,015	1,560±0,012**	1,350±0,011*	1,276±0,014

Более существенная разница аминокислотного состава спермы петухов по отношению к контролю наблюдается в I опытной группе по аспарагиновой кислоте – на 17,69 (P<0,05), глутаминовой кислоте – на 9,47 (P<0,05), серину – на 25,87 (P<0,05), аланину – на 31,09 % (P<0,05).

Содержание остальных изучаемых аминокислот в сперме петухов опытных групп имело тенденцию к увеличению или находилось на уровне контроля.

В итоге сумма аминокислот в сперме петухов I опытной группы превышала контроль на 23,81 (P<0,01), II опытной – на 7,14 (P<0,05) и в III – на 1,27 %.

Мониторинг параметров яйценоскости

Продуктивность кур на всем протяжении учетного периода (19-62 недели) была высокой и соответствовала ее стандарту породы, однако в опытных группах яйценоскость кур-несушек превышала контроль (табл. 11).

Таблица 11. Продуктивность птицы

Возраст, недель	контрольная		I опытная		II опытная		III опытная	
	получено яиц, шт.	яйценоскость, %						
1	2	3	4	5	6	7	8	9
19	19	4,24	22	4,91	28	6,25	28	6,25
20	81	18,08	78	17,41	82	18,30	80	17,86
21	211	49,61	232	54,33	210	49,18	206	48,24
22	328	76,81	356	83,37	332	77,75	339	79,39
23	374	87,59	380	88,99	372	87,12	379	88,76
24	381	89,23	388	90,87	387	90,63	386	90,39
25	384	89,93	392	91,88	390	91,33	388	90,87
26	394	92,27	398	93,21	397	92,97	397	92,97
27	397	92,97	401	93,91	398	93,21	399	93,24
28	399	93,24	402	94,15	400	93,68	401	93,91
29	397	92,97	404	94,61	402	94,15	403	94,38
30	400	93,68	405	94,85	402	94,15	403	94,38
31	402	94,15	408	95,55	405	94,85	405	94,85
32	404	94,61	409	95,78	406	95,08	406	95,08
33	406	95,08	409	95,78	408	95,55	407	95,32
34	408	95,55	409	95,78	408	95,55	411	96,25
35	408	95,55	410	96,02	408	95,55	412	96,49
36	407	95,32	409	95,78	407	95,32	410	96,02
37	407	95,32	409	95,78	407	95,32	409	95,78
38	406	95,08	408	95,55	407	95,32	407	95,32
39	406	95,08	409	95,78	407	95,32	406	95,08
40	406	95,08	409	95,78	407	95,32	406	95,08
41	405	94,85	407	95,32	406	95,08	405	94,85
42	402	94,15	405	94,85	404	94,61	403	94,38
43	400	93,68	404	94,61	402	94,15	401	93,91
44	399	93,44	402	94,15	401	93,91	400	93,68
45	397	92,97	400	93,68	398	93,21	397	92,97
46	391	91,57	396	92,74	393	92,03	392	91,80
47	385	90,16	391	91,57	389	91,10	387	90,63
48	385	90,16	390	91,33	387	90,63	386	90,40
49	383	89,69	387	90,63	385	90,16	384	89,93

50	382	89,46	388	90,87	384	89,93	383	89,69
51	383	89,69	389	91,10	385	90,16	383	89,69
52	384	89,93	389	91,10	386	90,40	384	89,93
53	382	89,46	387	90,63	386	90,40	383	89,70
54	381	89,23	387	90,63	385	90,16	382	89,46
55	380	88,99	386	90,40	384	89,93	380	88,99
56	379	88,76	384	89,93	383	89,70	380	88,99
57	378	88,52	384	89,93	382	89,46	379	88,76
58	379	88,76	382	89,46	380	88,99	378	88,52
59	377	88,29	382	89,46	379	88,76	378	88,52
60	376	88,01	381	89,23	379	88,76	377	88,29
61	376	88,01	381	89,23	378	88,52	377	88,29
62	377	88,29	383	89,70	380	88,99	378	88,52
19-62	16306	86,79	16532	87,99	16412	87,35	16385	87,21

За учетный период в I опытной группе было получено наибольшее количество яиц – 16532, во II – 16412 и в III – 16385 штук, что выше, чем в контроле на 222, 106 и 79 яиц или 1,39; 0,65 и 0,48% соответственно.

При достижении птицей возраста 28-ми недель была проведена инкубация яиц, полученных от кур подопытных групп. Перед инкубацией мы провели морфологический анализ яиц, который включает в себя внешний осмотр и внутреннее содержание яиц (табл. 12).

Таблица 12. Морфологические показатели инкубационных яиц (n=10)

Показатель	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Масса яйца, г	61,64±0,42	63,49±0,67*	62,87±0,49	63,11±0,37*
Масса составных частей, г:				
белка	36,48±0,29	37,15±0,31	37,00±0,27	37,06±0,40
желтка	18,89±0,17	19,55±0,19*	19,26±0,15	19,32±0,13
скорлупы	6,27±0,09	6,79±0,08**	6,61±0,07*	6,73±0,08**
Индекс формы, %	75,93±0,51	75,04±0,43	75,92±0,32	75,18±0,64
Индекс белка, %	9,12±0,14	9,92±0,16**	9,68±0,11*	9,84±0,15**
Индекс желтка, %	44,85±0,69	48,83±0,54**	48,18±0,61**	48,51±0,47**
Единицы ХАУ	81,47±0,27	82,92±0,33**	82,67±0,28*	82,81±0,36*
Толщина скорлупы, мкм	358,00±2,14	370,00±2,28**	365,00±2,11*	368,00±1,99*
Соотношение частей яйца, %:				
белок	59,18±0,27	58,51±0,14	58,85±0,13	58,72±0,17
желток	30,65±0,18	30,79±0,15	30,63±0,17	30,61±0,21
скорлупа	10,17±0,04	10,69±0,06	10,51±0,05	10,66±0,06
Отношение белок/желток	1,93±0,015	1,90±0,018*	1,92±0,014	1,92±0,013

В нашем опыте морфологический анализ инкубационных яиц показал, что масса яиц опытных групп превышала контроль на 3,00 (P<0,05), 1,99 и 2,38% (P<0,05). Увеличение массы яиц произошло за счет массы желтка, которая увеличилась на 3,49 (P<0,05), 1,96 и 2,28% относительно контроля.

В опытных группах снизился показатель отношения массы белка к массе желтка до 1,90 (P<0,05), 1,92 против 1,93 в контроле. В норме отношение белок/желток должно быть близким к 1,9/1 [35].

Качество белка принято оценивать по индексу белка и единицам ХАУ. Количество плотного белка в яйцах, предназначенных для инкубации, признано одним из основных показателей при оценке их качества. Установлена зависимость выводимости яиц от показателя белка, выраженного единицами ХАУ [36].

По мнению Царенко П.П. [37], за последние годы показатель единиц ХАУ увеличился на 8-12% за счёт ускоренного формирования яиц высокопродуктивной птицы, плотный белок просто не успевает разжигаться.

Индекс белка в опытных группах был достоверно выше контроля на 8,77 (P<0,01), 6,14 (P<0,05) и 7,89 (P<0,01), а число единиц ХАУ – на 1,78 (P<0,01), 1,47 (P<0,05) и 1,64% (P<0,05) соответственно.

В наших исследованиях толщина скорлупы яиц кур-несушек опытных групп превышала контроль на 3,35 (P<0,01), 1,96 (P<0,05) и 2,79% (P<0,05).

Поскольку состав яиц в значительной степени зависит от кормления птицы и соответственного насыщения плазмы крови питательными веществами и липопротеинами, этот биологический эффект может быть использован для улучшения как питательных, так и инкубационных качеств.

В наших исследованиях испытывались биологически активные добавки, которые активизировали обменные процессы в организме кур и могли повлиять на химический состав инкубационных яиц (табл. 13).

Таблица 13. Химический состав инкубационных яиц, % (n=5)

Показатель	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
1	2	3	4	5
Содержится в белковой части				
Сухого вещества	11,824±0,068	12,282±0,062	12,124±0,097	12,167±0,091
Протеина	10,466±0,015	10,852±0,018	10,701±0,019	10,755±0,047
Жира	0,019±0,004	0,021±0,003	0,022±0,004	0,023±0,002
Углеводов	0,826±0,018	0,882±0,008	0,881±0,009	0,864±0,005
Золы	0,513±0,006	0,527±0,038	0,520±0,017	0,525±0,011
Содержится в желтке				

Сухого вещества	49,895±0,034	51,729±0,027	51,415±0,037	51,484±0,032
Протеина	15,515±0,013	16,934±0,012	16,995±0,016	16,914±0,011
Жира	32,202±0,012	32,585±0,026	32,264±0,028	32,273±0,031
Углеводов	1,131±0,004	1,158±0,005	1,143±0,008	1,145±0,007
Золы	1,047±0,013	1,052±0,014	1,053±0,017	1,052±0,015

Исследования показали, что в яйцах, полученных от кур-несушек опытных групп наблюдалась тенденция увеличения содержания протеина в белковой части яиц на 0,39; 0,24 и 0,29%, а в желтке на 1,42; 1,48 и 1,40%.

Содержание жира в белке находилось практически на уровне контроля, а в желтке превышало контроль на 0,38; 0,062 и 0,071%.

Результаты наших исследований показали, что уровень витаминов в печени как кур, так и петухов опытных групп значительно превышал контроль (таблица 14).

Таблица 14. Витаминный состав печени птиц и инкубационных яиц, мкг/г (n=5)

Показатель	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
1	2	3	4	5
Содержится в печени кур (возраст 28 недель)				
Витамин А	804,31±4,12	842,11±5,21**	839,27±4,91**	833,81±3,89**
Витамин Е	94,17±3,01	123,68±2,18**	119,71±2,39**	120,59±2,17**
Витамин В ₁	4,08±0,07	4,76±0,05**	4,71±0,06**	4,75±0,08**
Витамин В ₂	17,65±0,33	20,91±0,27**	20,61±0,19**	21,15±0,13***
Содержится в печени петухов (возраст 28 недель)				
Витамин А	829,34±5,84	881,93±6,17**	880,77±4,95**	883,15±6,03**
Витамин Е	74,11±3,21	89,42±2,89*	89,15±3,61*	90,04±2,67*
Витамин В ₁	4,53±0,09	5,05±0,11*	4,94±0,07*	4,99±0,11*
Витамин В ₂	18,31±0,43	21,46±0,51**	21,53±0,55**	21,39±0,42**
Содержится в желтке яиц				
Каротиноиды	15,84±0,07	17,72±0,09***	17,69±0,08***	17,70±0,07***
Витамин А	7,49±0,08	9,03±0,09***	8,71±0,07***	8,88±0,09***
Витамин Е	124,37±2,14	143,61±2,89**	139,97±3,06*	141,74±1,91**
Витамин В ₁	5,18±0,13	6,29±0,17**	6,18±0,11**	6,23±0,15**
Витамин В ₂	6,75±0,12	7,58±0,15*	7,49±0,19*	7,55±0,13*
Содержится в белке яиц				
Витамин В ₂	2,57±0,04	2,84±0,03**	2,79±0,05*	2,81±0,02**

Так, содержание витамина А (ретинол) в печени кур превышало контроль на 4,70 (P<0,01), 4,35 (P<0,01) и 3,68% (P<0,01), петухов – на 6,34 (P<0,01), 6,20 (P<0,01) и 6,49% (P<0,01); содержание витамина Е (токоферол) в печени кур – на 31,34 (P<0,01), 27,12 (P<0,01) и 28,06% (P<0,01), петухов – на 20,66 (P<0,05), 20,29 (P<0,05) и 21,49% (P<0,01). Содержание витаминов группы В также превышало контроль. Уровень витамина В₁ (тиамин) в печени кур оказался выше контроля на 16,67 (P<0,01), 15,44 (P<0,01) и 16,42% (P<0,01), петухов – на 11,48 (P<0,05), 9,05 (P<0,05) и 10,15% (P<0,05); уровень витамина

В2 (рибофлавин) в печени кур – на 18,47 (P<0,01), 17,65 (P<0,01) и 19,83% (P<0,001), петухов – на 17,20 (P<0,01), 17,58 (P<0,01) и 16,82% (P<0,01).

Аналогичная картина наблюдается при изучении витаминного состава яиц (желток, белок). Содержание каротиноидов в желтке яиц, полученных от кур опытных групп превышало контроль на 11,87 (P<0,001), 11,68 (P<0,001) и 11,74% (P<0,01), витамина А – на 20,56 (P<0,001), 16,29 (P<0,001) и 18,56% (P<0,001), витамина Е – на 15,47 (P<0,01), 12,54 (P<0,05) и 13,97% (P<0,01), витамина В1 – на 21,43 (P<0,01), 19,31 (P<0,01) и 20,27% (P<0,01), витамина В2 – на 12,29 (P<0,05), 10,96 (P<0,05) и 11,85% (P<0,05).

Концентрация витамина В2 в белке яиц, полученных от кур опытных групп также была выше контроля на 10,51 (P<0,01), 8,56 (P<0,05) и 9,34% (P<0,01).

Такое значительное увеличение витаминов в печени и инкубационных яйцах птиц опытных групп можно объяснить тем, что в качестве наполнителя в испытуемых добавках используется экструдированный тыквенный жмых, который является прекрасным источником витаминов.

Перед инкубацией яйца отбирают по внешним признакам и путем просвечивания на овоскопе. При внешнем осмотре яиц учитывают их массу, форму, состояние и качество скорлупы.

Была трижды проведена инкубация яиц с предварительным отбором по внешним признакам (масса, форма, состояние и качество скорлупы) и путем просвечивания на овоскопе; полученные в результате инкубации данные показали, что во всех подопытных группах вывод цыплят оказался высоким и соответствовал нормативам, характеризующим кросс (табл. 15).

Таблица 15. Результаты инкубации яиц

Показатель	Группа							
	контрольная		I опытная		II опытная		III опытная	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
возраст птицы 224 дня, вывод 05.04.2017								
Заложено яиц в инкубатор	280	100	280	100	280	100	280	100
Оплодотворенность яиц	260	92,86	264	94,29	262	93,57	263	93,93
Отходы инкубации, в т.ч.:								
неоплодотворенные яйца	20	7,14	16	5,71	18	6,42	17	6,07
«кровавое кольцо»	12	4,29	10	3,57	9	3,21	10	3,57
замершие эмбрионы	9	3,21	10	3,57	11	3,93	13	4,64

задохлики	8	2,86	7	2,51	7	2,51	7	2,51
Выведено молодняка, гол.	231	-	237	-	235	-	233	-
Вывод здоровых цыплят, %	-	82,50	-	84,64	-	83,93	-	83,21
Выводимост ь яиц, %	-	88,85	-	89,77	-	89,69	-	88,59
возраст птицы 314 дней, вывод 04.07.2017								
Заложено яиц в инкубатор	272	100,00	272	100,00	272	100,00	27 2	100,00
Оплодотвор енность яиц	258	94,85	264	97,06	264	97,06	26 0	95,59
Отходы инкубации в т.ч.:								
неоплодотво ренные яйца	14	5,14	8	2,94	8	2,94	12	4,41
«кровяное кольцо»	9	3,31	8	2,94	9	3,31	9	3,31
замершие эмбрионы	11	4,05	10	3,68	8	2,94	10	3,68
задохлики	10	3,68	10	3,68	11	4,05	11	4,05
Выведено молодняка, гол	228	-	236	-	236	-	23 0	-
Вывод здоровых цыплят, %	-	83,82	-	86,76	-	86,76	-	84,55
Выводимост ь яиц, %	-	88,37	-	89,39	-	89,39	-	88,46
возраст птицы 403 дня, вывод 01.10.2017								
Заложено яиц в инкубатор	272	100,00	272	100,00	272	100,00	272	100,00
Оплодотвор енность яиц	258	94,85	264	97,06	262	96,32	26 0	95,59
Отходы инкубации в т.ч.:								
неоплодотво ренные яйца	14	5,14	8	2,94	10	3,68	12	4,41
«кровяное кольцо»	11	4,05	10	3,68	11	4,05	11	4,05
замершие эмбрионы	13	4,78	11	4,05	12	4,41	12	4,41
задохлики	13	4,78	12	4,41	12	4,41	13	4,78
Выведено молодняка,	221	-	231	-	227	-	22 4	-

гол								
Вывод здоровых цыплят, %	-	81,25	-	84,92	-	83,45	-	82,35
Выводимость яиц, %	-	85,66	-	87,50	-	86,64	-	86,15

Результаты первой закладки яиц в инкубатор (вывод 05.04.2017) показали, что в I опытной группе вывод цыплят превышал контроль на 2,14% и составил 84,64 против 82,50 в контроле. Во II опытной группе превышение составило 1,43%, в III опытной – всего 0,71 (практически на уровне контроля). Более высокий вывод цыплят в опытных группах был получен за счет увеличения оплодотворенности яиц и снижения числа гибели эмбрионов в первые 7 суток инкубации. Это свидетельствует о биологически полноценном кормлении кур родительского стада.

В результате второй закладки (вывод 04.07.2017) выявлено, что вывод цыплят повысился во всех подопытных группах в сравнении с первой закладкой. Вывод цыплят в I и II опытных группах составил 86,76%, что выше контроля на 2,94%, в III опытной группе – 84,55%, что превышает контроль на 0,73%. Такие высокие показатели вывода цыплят в I и II опытных группах получены за счет увеличения оплодотворенности яиц до 97,06%, соответственно и выводимость яиц достигла максимальных значений – 89,39%.

Анализ результатов инкубации яиц третьей закладки (01.10.2017) показал, что, несмотря на некоторое снижение вывода цыплят во всех опытных группах относительно предыдущей закладки, оставался высоким и соответствовал нормативным показателям данного кросса. Незначительное снижение вывода цыплят является закономерным и объясняется возрастом птицы.

Разница между выводом цыплят в опытных группах относительно контроля составило 3,67; 2,20 и 1,10 %.

В нашем исследовании внесение в рацион птиц пробиотических бактерий приводило к улучшению гематологического и биохимического состава крови, спермопродукции, яйценоскости, качеству яиц и их выводимости. В первую очередь это связано с продукцией данными штаммами метаболитов, проявляющих антиоксидантные и ДНК-протекторные свойства, как было показано в нашей работе [1]. С учётом простоты и дешевизны методики получения пробиотических препаратов на основе сои, применение подобных препаратов может быть эффективным в современном животноводстве.

6.2. Данные по стабильности ДНК и длины теломер групп кур, получающих стандартный корм и корм, обогащенный пробиотическими

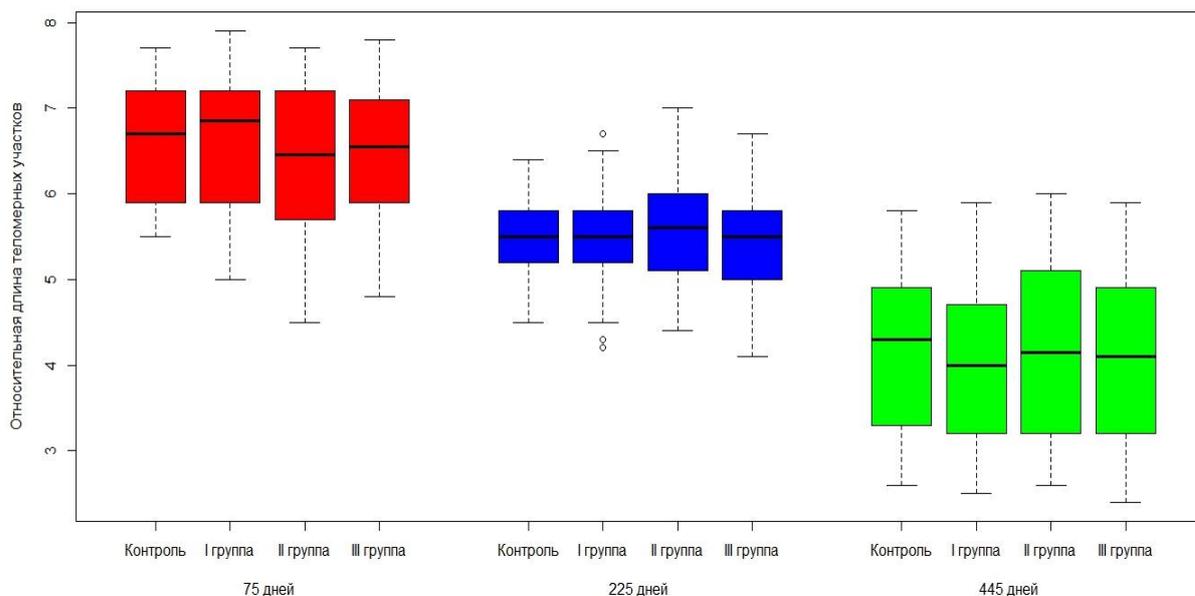


Рис.4. Относительная длина теломерных участков хромосом у контрольной и трех опытных групп кур различных возрастов: 75, 225 и 445 дней. Параметры выборки даны в стандартной форме «box-whisker plots», принятой для пакета R Studio.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Studio v. 1.0.136 <https://www.rstudio.com/>. В большинстве исследуемых групп полученные значения не соответствовали нормальному распределению. И для статистической оценки различий использовали U-критерий Манна — Уитни.

С увеличением возраста птиц, как в контрольной, так и в трех опытных группах, длина теломерных участков достоверно ($P < 0.01$) уменьшалась. На 13-18 % было выявлено снижение длины теломер у 225 суточных птиц, по сравнению с 75 суточными и на 25-28 % снижение – у 445 суточных, по сравнению с 225 суточными птицами. Полученные нами данные о возрастных изменениях длины теломерных участков у кур коррелируют с результатами других исследований [40, 41]. Статистически значимых различий в относительной длине теломер между контрольной и экспериментальными группами не установлено.

Оценка стабильности ДНК. Количественный анализ повреждений митохондриальной (мтДНК) и ядерной (ядДНК) ДНК исследовали в образцах, которые мы использовали для оценки относительной длины теломерных участков хромосом, путем измерения концентрации длинных (более 10 т.п.н.) ПЦР продуктов (по конечной точке) с последующей поправкой на уровень копияности митохондриальной или ядерной ДНК.

Повреждения в мтДНК оценивали согласно методике, разработанной нами в ходе предыдущего этапа проекта. Повреждения в яДНК анализировали, как и в мтДНК, за исключением количества циклов лонг ПЦР – 31 (на один больше, чем в случае мтДНК) и праймеров (прямой гена *gapdh* (5'- САТСАААТGGGCGGATGCAG-3') и обратный 5'- СТGTGGGGTTGGCACAАААG-3'). Размеры полученных, в ходе лонг ПЦР, ампликонов были схожи 10040 п.н. (мтДНК) и 10070 п.н. (яДНК). Для оценки копийности яДНК использовали данные ПЦР-РВ для гена *gapdh*, полученные при исследовании относительной длины теломер.

Оценка относительного количества повреждений ДНК [42] подразумевает выбор образца сравнения. В качестве такого образца мы использовали средние значения концентраций ПЦР продуктов ДНК из клеток крови суточных цыплят, которые составили 64 (мтДНК) и 52 (яДНК) нг\мкл. Относительную количественную оценку повреждений в мтДНК и в яДНК рассчитывали по формулам $-\ln(X/64)$, где X значение концентрации (нг\мкл) ампликонов 10040 п.н. и $-\ln(Y/52)$, где Y значение концентрации (нг\мкл) ампликонов 10070 п.н., соответственно.

Полученные результаты относительного числа повреждений митохондриальной ДНК на 10 т.п.н. представлены на рисунке 5. Этот показатель у 75 суточных птиц в контрольной группе составил 0.12 ± 0.06 , в I экспериментальной группе - 0.09 ± 0.06 , во II – 0.13 ± 0.08 и в III - 0.11 ± 0.07 ; у 225 суточных птиц - 0.85 ± 0.19 в контрольной группе, 0.71 ± 0.12 в I группе, 0.86 ± 0.2 во II группе и 0.80 ± 0.16 в III группе; у 445 суточных птиц - 1.48 ± 0.33 – контрольная группа, 1.21 ± 0.36 – I группа, 1.5 ± 0.31 - II группа и 1.41 ± 0.29 – III группа.

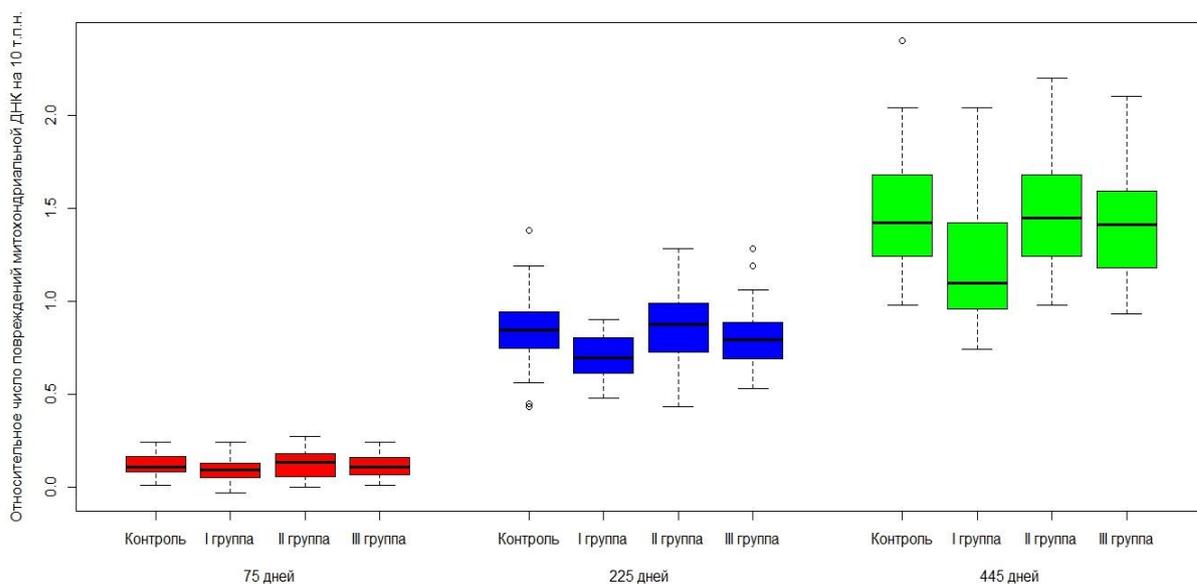


Рис. 5. Относительное число повреждений в митохондриальной ДНК на 10 т.п.н. у контрольной и трех опытных групп кур различных возрастов: 75, 225 и 445 дней.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Studio v. 1.0.136. В большинстве исследуемых групп полученные значения соответствовали нормальному распределению. Для статистической оценки различий использовали как параметрический (Т-критерий Стьюдента), так и непараметрический критерий (U-критерий Манна — Уитни).

С увеличением возраста птиц, число повреждений в митохондриальной ДНК достоверно ($P < 0.01$) увеличивалось, как в контрольной, так и в трех опытных группах. Однако статистически значимое снижение относительного числа повреждений в мтДНК по сравнению с контрольной группой было выявлено только в I группе, а именно: на 75 день эксперимента обнаружена тенденция ($P = 0.093$) к снижению числа повреждений, у 225 суточных птиц – 20% снижение ($P = 0.0013$), а у 445 – 22% снижение ($P = 0.003$). Статистически значимых различий между контролем и группами II, III не обнаружено. Таким образом, продолжительное потребление корма (более 75 суток), обогащенного пробиотическим препаратом *Bacillus subtilis* КАТМІРА 1933 (группа I) повышает стабильность митохондриальной ДНК у кур. Очевидно, полученный ДНК протекторный эффект, может быть индуцирован антиоксидантом/ми, синтезируемые *B. subtilis* КАТМІРА 1933. В связи с тем, что исследования действия пробиотиков на стабильность митохондриальной ДНК у млекопитающих и, особенно, у птиц приведены в литературе только в единичных публикациях [43,44], полученные нами результаты представляют особый интерес.

Полученные результаты относительного числа повреждений ядерной ДНК на 10 т.п.н. представлены на рисунке 6. Этот показатель у 75 суточных птиц в контрольной группе составил 0.17 ± 0.12 , в I экспериментальной группе - 0.17 ± 0.11 , во II – 0.19 ± 0.15 и в III - 0.16 ± 0.13 ; у 225 суточных птиц 0.7 ± 0.21 – контрольная группа, 0.66 ± 0.22 – I группа, 0.76 ± 0.25 - II группа и 0.71 ± 0.2 - III группа; у 445 суточных птиц 1.48 ± 0.45 – контрольная группа, 1.39 ± 0.40 – I группа, 1.52 ± 0.48 - II группа, 1.45 ± 0.39 - III группа. Статистическую обработку данных проводили также, как и в случае анализа стабильности мтДНК.

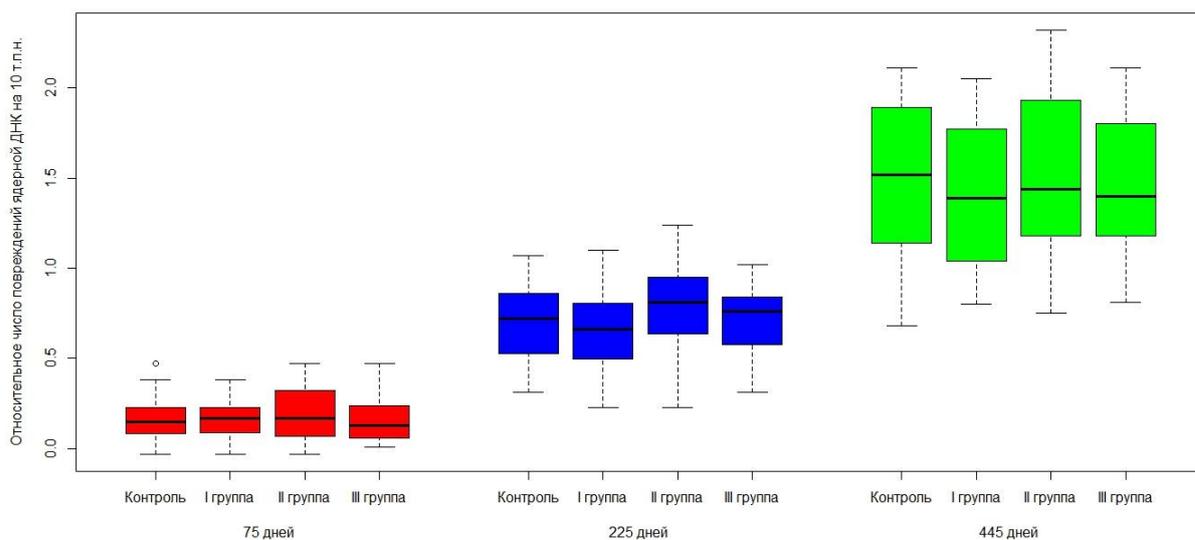


Рис.3. Относительное число повреждений в ядерной ДНК на 10 т.п.н. у контрольной и трех опытных групп кур различных возрастов: 75, 225 и 445 дней.

С увеличением возраста птиц число повреждений в ядерной ДНК достоверно ($P < 0.01$) повышалось, как в контрольной, так и в трех опытных группах. В отличие от мтДНК, статистически значимых различий в стабильности ядерной ДНК между контрольной и экспериментальными группами кур не наблюдалось, за исключением тенденции ($P = 0.095$) к снижению числа повреждений ядерной ДНК у I группы в возрасте 445 дней. Так как, количество активных форм кислорода (АФК), повреждающих структуру ДНК в эукариотических клетках, значительно выше в митохондриях, чем в ядре, можно предположить, что ДНК протекторный эффект пробиотической добавки *B. subtilis* КАТМІРА 1933 оказался более выраженным в случае митохондриальной ДНК, чем ядерной. Интересно также отметить, что выявленные нами возрастные изменения стабильности ядерной и митохондриальной ДНК у кур сходны, в то время как у млекопитающих с возрастом в мтДНК количество повреждения в 2-4 раза выше, чем в ядерной [45, 46, 47]. Этот эффект может быть связан с более эффективной работой электрон транспортной цепи у птиц по сравнению с млекопитающими, что несомненно сказывается на уровне АФК [48, 49].

В результате статистической оценки взаимосвязи стабильности ДНК и длины теломерных участков хромосом с использованием критериев Пирсона и Спирмана корреляций не обнаружено. Отсюда можно заключить, что данные показатели у кур изменяются как с возрастом, так и при различной диете, независимо.

Таким образом, полученные значения длины теломерных участков хромосом и повреждения митохондриальной и ядерной ДНК у контрольной и опытных групп кур свидетельствуют об отсутствии негативного (генотоксического) влияния пробиотических препаратов, а также позитивном (увеличение стабильности митохондриальной ДНК) эффекте пробиотической добавки *Bacillus subtilis* КАТМІРА 1933.

7. Протокол тестирования генотоксичности и мутагенности кормов с использованием S-9 фракции печени кур. Результаты текущего контроля качества корма.

Задачей данного проекта является оценка эффективности препаратов пробиотических бактерий, выделяющих в окружающую среду вещества, инактивирующие активные формы кислорода (АФК) и стабилизирующие ДНК клетки. Предположение о существовании такой активности основано на представлении о старении как «медленном отравлении» эндогенными прооксидантами и генотоксинами [50]. При этом признание запрограммированности старения отнюдь не противоречит представлениям об участии в реализации такой программы свободнорадикальных механизмов и повреждения ДНК [51]. Очевидно, что важным условием чистоты хронического эксперимента по замедлению старения с помощью протекторов от эндогенных токсинов является сведение к минимуму, а в идеале - отсутствие, контактов тест-объекта с токсинами экзогенными. Поэтому помимо стандартного контроля содержания в корме исследуемых птиц токсинов, осуществляемого методами химического анализа было принято решение о дополнительном контроле методами тестирования мутагенности и генотоксичности с помощью модельных систем, в которых присутствуют живые клетки. В ходе предыдущего этапа проекта был применен комплекс методов с использованием LUX-биосенсоров на основе *E. coli* и теста Эймса (*Salmonella*/микросомы). Для метаболической активации промутагенов использовали S9 фракцию гомогената печени крыс. Данный препарат традиционно используется для выявления веществ, потенциально опасных для человека. Однако в условиях нашего проекта более логичным является использование препарата из печени кур. Необходимо отметить, что приоритет в использовании печени кур для активации промутагенов принадлежит отечественным ученым. В 80-х годах XX века сотрудниками кафедры генетики ЛГУ (ныне СПбГУ) было показано, что метаболические особенности печени кур позволяют получать препараты с высокой способностью к метаболической активации промутагенов без предварительной индукции птиц фенобарбиталом или арохлором [52]. В ходе наших исследований методические

подходы, сформулированные в исследованиях XX века, были конкретизированы применительно к задачам нашего проекта, объектом которого были куры.

Методика.

Экстракцию потенциальных генотоксинов проводили по методу [53]. Тестирование на биосенсорных штаммах *E.coli* MG1655 с плазмидами pRecA-lux (реагирует на повреждение ДНК), pKatG-lux (реагирует на генерацию перекиси водорода), pSoxS-lux (реагирует на супероксид-анион-радикал) и pXen7-lux (индикатор неспецифической токсичности) [53] проводили по методу [54]. Мутагенную активность определяли по методу [55].

Для оптимизации протокола получения S-9 фракции печени кур использовали четыре препарата фракции S9 для метаболической активации промутагенов.

Препарат №1 на основе гомогената печени крыс, получен по стандартной методике с использованием Арохлора 1254 (Sigma-Aldrich) [56]. Содержание белка в препарате – 10 мг/мл (биуретовый метод <http://www.olvex-d.ru/catalog/biohim-nabori/substraty/tovar-71.html>). Препарат хранили при -20°C.

Препарат № 2 получали по следующей методике. Кур используемого в проекте кросса Хайсекс-Браун возраста 133 дня веса 1,8 – 2,0 кг декапитировали, кровь сливали, тушки немедленно вскрывали, извлекали печень, промывали стерильным 0,1 М KCl и помещали на лед. Затем печень гомогенизировали в стальном механическом гомогенизаторе (MPW-302, Польша) в течение 2-х минут при скорости 2000 об/мин (предварительная гомогенизация) с последующей гомогенизацией в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в 9 объемах 0,15 М NaCl. Все операции гомогенизации также проводили на льду. Выделение микросомальной фракции проводили с помощью дифференциального центрифугирования по стандартной методике [57]. Содержание белка в препарате довели до 10 мг/мл разбавляя буфером для гомогенизации. Готовый препарат хранили при -20°C.

Препарат №3 получали по методике, аналогичной примененной для препарата №2. Готовый препарат хранили при -80°C.

Препарат №4 получали по методике, аналогичной примененной для препарата №2. За исключением того, что в буфер для гомогенизации добавляли 3% глицерина, а готовый препарат хранили при -20°C с добавлением глицерина до концентрации 30%.

В качестве стандартного промутагена, требующего контроля метаболической активации, использовались разведения 2-аминоантрацена в концентрациях 5, 10 и 50 мкг/мл в DMSO. В качестве отрицательного контроля на чашку вносили DMSO.

Результаты и их обсуждение.

Оптимизация протокола получения S-9 фракции из печени кур.

Результаты проверки качества препаратов микросомальной фракции представлены в таблице 1. Минимальной активирующей активностью обладает препарат №2. Тест Эймса с использованием штаммов TA100 и TA98 и данного препарата не позволяет зарегистрировать мутагенное действие 2-аминоантрацена в дозе 1 мкг на чашку. Активность препарата №1, на основе микросомальной фракции крысы, достаточна для выявления мутагенности всех вариантов обработки за исключением действия минимальной дозы 2-аминоантрацена на штамм TA98. Препараты №3 и 4 эффективны для всех сочетаний доз и штаммов.

Таким образом, можно сделать вывод, что хотя препарат фракции S-9 из печени кур, приготовленный и хранимый по стандартной методике, позволяет выявлять генетическую активность использованного промутагена в принципе, он обладает «повышенной требовательностью» к температуре хранения (табл. 16). Однако введение криопротектора глицерина в буфер для гомогенизации и в буфер для хранения позволило компенсировать этот недостаток. Ввиду вышеизложенного, для мониторинга качества корма далее использовали препарат S-9, полученный методом №4.

Таблица 16. Сравнение эффективности метаболической активации с использованием коммерческого лиофилизата S9 и гомогената печени крыс.

Штамм <i>Salmonella typhimurium</i>	Исследуемые образцы	Среднее число колоний на чашках			
		Препарат 1	Препарат 2	Препарат 3	Препарат 4
TA98	DMSO (Контроль)	26±5	19±5	24±3	25±5
	2-аминоантрацен (1 мкг/чашку)	32±6	28±8	150±21*	139±10*
	2-аминоантрацен (20 мкг/чашку)	864±92*	255±35*	987±115*	1010±93*
	2-аминоантрацен (50 мкг/чашку)	1680±239*	2100±156*	2040±234*	2110±190*
TA100	DMSO (Контроль)	209±14	210±17	176±19	206±14
	2-аминоантрацен (1 мкг/мл)	315±19*	205±44	357±34*	299±34*
	2-аминоантрацен (20 мкг/чашку)	508±64*	990±219*	2670±178*	2580±194*
	2-аминоантрацен (50 мкг/чашку)	2960±119*	3010±190*	3050±179*	3200±216*

* - статистически значимый мутагенный эффект (t-тест, $p < 0,05$)

Результаты текущего контроля качества корма.

Стандартные параметры токсичности корма не превышали нормативные показатели по ГОСТ 18221-99 (см. рис. 7).

Генотоксичность.

Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и КАТМІРА 1933, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов. При действии образца добавки наблюдалось подавление жизнедеятельности биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 рХen7-lux на 8,2 %; подобный эффект можно считать незначительным по сравнению с действием контрольного вещества (ZnSO₄). Для остальных штаммов при действии обоих образцов эффект был нулевым.

Мутагенность.

Оценку мутагенности корма проводили по методике, модифицированной с учетом полученных данных.

Опыт ставили в трех повторностях. На чашку вносили 50 мкл суточной культуры ТА100 и 50 мкл спиртового экстракта образца корма. В качестве отрицательного контроля использовали DMSO, в качестве положительного - азид натрия в концентрации 100 мкг/мл.

Результаты представлены в таблице 17. При действии спиртового экстракта корма не наблюдалось статистически достоверного усиления уровня мутагенеза, как в условиях метаболической активации, так и без нее (в последнем случае данные не приводятся, т.к. они не отличались статистически значимо (t -тест $p < 0,05$) от вариантов с метаболической активацией), тогда как положительный контроль демонстрировал обычное для данного теста усиление уровня мутагенеза.

Таблица 17. Мониторинг мутагенности корма, тест Эймса на штаммах ТА98 и ТА100, среднее число колоний.

№	Дата	Штаммы	Образцы				Заключение о мутагенности кормов +/-
			DMSO контроль	2-аминоантрацен (1 мкг/чашку, позитивный контроль)	Экстракт корма 1	Экстракт кормовой добавки 2	
1	11.01.17	ТА100	135±46	1115±56	141±15	111±17	-
		ТА98	68±4	470±36	87±19	37±9	-
2	9.02.17	ТА100	128±42	1102±49	133±19	111±17	-
		ТА98	63±4	457±27	66±14	58±10	-
3	13.03.17	ТА100	119±39	1122±50	124±17	115±14	-
		ТА98	59±5	488±39	67±12	57±11	-
4	10.04.17	ТА100	140±49	1123±63	133±21	154±22	-

		TA98	71±8	468±42	65±17	34±6	-
5	11.05.17	TA100	125±36	1222±61	121±16	130±14	-
		TA98	78±8	483±24	90±18	47±10	-
6	10.06.17	TA100	149±53	1141±59	155±22	139±19	-
		TA98	69±7	483±35	67±20	44±11	-
7	10.07.17	TA100	129±45	1200±64	134±13	121±12	-
		TA98	58±5	406±31	67±19	46±8	-
8	11.08.17	TA100	142±49	1115±56	139±14	133±17	-
		TA98	49±4	399±26	57±18	60±11	-
9	11.09.17	TA100	134±46	1133±60	141±15	111±17	-
		TA98	66±6	461±37	77±19	42±9	-
10	12.10.17	TA100	148±53	1194±59	151±19	122±14	-
		TA98	77±8	483±40	80±18	51±12	-
11	1.11.17	TA100	128±38	1165±51	156±15	124±13	-
		TA98	72±7	434±30	69±14	46±9	-

Таким образом, можно заключить, что изученные образцы корма не содержат потенциальных генотоксинов и мутагенов.

ЗАО "Агрофирма "Восток"

РОССИЯ

УДОСТОВЕРЕНИЕ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПОЛНОРАЦИОННОГО КОМБИКОРМА

№ 265 от 23.11.2017

РЕЦЕПТ КОМБИКОРМА №ПК-1-2 П-181

Для ПК-1-2 П ХАЙСЕКС КОРИЧНЕВЫЙ НЕСУШКИ 40-60 НЕДЕЛЬ

Дата выработки: 23.11.2017

Смена: 1

Сертификат соответствия:

Вид продукции: РАССЫПНОЙ

Вес, т.

Получатель: СП "СВЕТЛЫЙ" №5

Накладная №: _____

Вагон/авто №

Срок хранения: 1 месяц со дня выработки

Номер приказа: 0

Состав рецепта		Дополнительно введено витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма			Показатели качества		
Наименование	%	Наименование	Ед. изм.	Знач.	Наименование	Ед. изм.	Знач.
КУКУРУЗА	27,000 %	ВИТАМИН А	тыс.МЕ	15,00	ОЭ ПТИЦЫ	Ккал/100г	275
ПШЕНИЦА	22,590 %	ВИТАМИН D3	тыс.МЕ	3,00	СЫР.ПРОТЕИН	%	16,57
ШРОТ ПОДС. СП 34%, СК 19	17,000 %	ВИТАМИН Е	мг	80,00	СЫРОЙ ЖИР	%	7,55
СОЯ ПОЛНОЖИР. ЭКСТР. 34%	13,000 %	ВИТАМИН К3	мг	3,00	ЛИНОЛЕВ.КИСЛ	%	4,03
РАКУШЕЧНАЯ МУКА	7,000 %	ВИТАМИН В1	мг	2,49	СЫР.КЛЕТЧАТ.	%	6,39
МУКА ТРАВ. ЛЮЦ СП 17%	5,000 %	ВИТАМИН В2	мг	7,98	ЛИЗИН	%	0,82
МАСЛО ПОДСОЛНЕЧНОЕ	3,500 %	ВИТАМИН В3	мг	19,98	МЕТИОНИН	%	0,38
КВМ (П1-1) РОДИТЕЛЬСКОЕ	3,000 %	ВИТАМИН В4	мг	650,01	МЕТ.+ЦИСТИН	%	0,66
МОНОКАЛЬЦИЙФОСФАТ	1,200 %	ВИТАМИН В5	мг	42,12	ТРИПТОФАН	%	0,18
L-лизин сульфат 65%	0,320 %	ВИТАМИН В6	мг	6,00	Ca	%	3,50
СОЛЬ ПОВАРЕННАЯ	0,300 %	ВИТАМИН В12	мг	0,024	P	%	0,66
DL-МЕТИОНИН 98.5%	0,090 %	ВИТАМИН Вc	мг	1,20	Р УСВОЯЕМЫЙ	%	0,41
		ВИТАМИН Н	мг	0,24	Na	%	0,15
		Fe	мг	27,00	Cl	%	0,22
		Cu	мг	8,01	НЕ ТОКСИЧЕН		
		Zn	мг	70,02	Влажность: 10,110%		
		Mn	мг	99,99			
		Co	мг	0,99			
		J	мг	0,99			
		Se	мг	0,20			

В рецепт введены:

Прочие добавки: L-лизин сульфат 65% 3200,00 г/т.



Является полнорационным комбикормом. Скармливать с начала яйцекладки в течение всего цикла яйценоскости. Необходимо постоянное наличие свежей воды.

технолог к/цеха: *Евгений* Шамшин Е.И.

Рис. 7. Удостоверение качества и безопасности корма, используемого в эксперименте.

8. Обсуждение связи наблюдаемых феноменов с фундаментальными проблемами теории старения.

Ключевой вопрос современной теории старения состоит в верификации одной из двух «концепций», или, по словам В.П. Скулачева, двух точек зрения.

Одна точка зрения может быть обозначена как «старение – износ», а вторая, которую Скулачев называет оптимистической, как «старение – программа» [58,59]. Каждая из этих концепций образует в свою очередь некое интеллектуальное пространство для теорий низшего уровня. Вторая концепция была развита Скулачевым и его

последователями до «панконцепции» фенотоза. Признание существования целого ряда фенотозных программ, одной из которых является старение позволило использовать в теоретических построениях мощный логический инструментарий, основанный на поиске и анализе аналогий (не только биологических).

Как все фундаментальные биологические коллизии, вопрос, поставленный нами в начале раздела, имеет не только теоретическое, но и конкретное значение для практической геронтологии. Если старение это результат износа, а именно накопления значительного числа мелких повреждений, то для его эффективного замедления необходимо использовать «облако» мелких воздействий, сложную смесь препаратов, комбинацию физических и химических факторов и т.п. Если же старение результат работы специальной генетической программы, то для ее отключения лучше подойдет адресное воздействие, направленное в наиболее чувствительную часть такой программы. С этой точки зрения концепция старения как программы действительно оптимистична, так как позволяет надеяться на существование простого метода ее отключения.

Однако, принятие гипотезы запрограммированного старения неизбежно порождает вопрос о том, какие преимущества дает эта программа популяциям, состоящим из стареющих особей. Ясно, что в случае отсутствия таких преимуществ любая достаточно сложная программа была бы элиминирована случайными мутациями, которые в этой ситуации были бы адаптивными. Поэтому одним из фундаментальных предположений, лежащих в основе концепции фенотоза, является следующее: генетические программы, разрушительные для отдельных особей, могут быть адаптивными для биологических сообществ. Частным случаем такого предположения является гипотеза о старении как ускорителе эволюции. По ряду причин, главная из которых - проблематичность экспериментальной проверки эволюционных гипотез, верификация вышеназванной гипотезы может быть основана преимущественно на анализе внутренней непротиворечивости эвристических моделей и их соответствия бесспорным наблюдаемым фактам. Для иллюстрации механизма ускорения, а главное, структурирования эволюционного процесса в сообществах, включающих закономерно ослабленных особей, В.П. Скулачевым была предложена в 2003 году концептуальная модель, названная им позже “басней о зайцах” [60,61]. Несмотря на простоту, данная модель обладает несомненной внутренней логикой. Естественным направлением проверки концептуальных моделей является их перевод на язык математики. Нами была создана вариация известной мультиагентной модели “хищник-жертва”, которая позволяет “увидеть”, как присутствие в популяции жертвы закономерно ослабленных (старых)

особей стимулирует отбор особей с признаками, адаптивный потенциал которых не девальвируется с возрастом.

Модель (<http://homebear.ru/PD>) разработана на платформе Java, 6-я версия. Среда разработки NetBeans 8.2. Статистический анализ и подготовка иллюстративных материалов проводились с использованием среды R, версия 3.4.1.

Результаты численных экспериментов, поставленных с помощью нашей модели, в принципе соответствуют положениям эвристической модели В.П. Скулачева, а, следовательно, подтверждают отсутствие в ней принципиальных логических противоречий.

Принятие гипотезы старения-феноптоза если не в качестве истинной, то по крайней мере заслуживающей рассмотрения, позволяет в свою очередь выдвинуть гипотезу для объяснения наиболее непонятного из феноменов, обнаруженных в нашем исследовании, а именно того, что по целому ряду параметров, стимулирующий (адаптогенный) эффект наших препаратов по отдельности сильнее эффекта их суммы. Так, в частности, статистически значимое снижение такого геронтологически значимого параметра, как относительное число повреждений в митохондриальной ДНК (повышение ее стабильности) в экспериментальной группе птиц, принимавших *Bacillus subtilis* КАТМІРА1933 (группа I), по сравнению с контрольной группой было выражено сильнее (на 20-22 %), чем в группе, принимавшей смесь препаратов. Данный эффект проявляется и при изучении физиологических параметров: длина и масса яйцевода у молодых группы, принимавшей *Bacillus subtilis* КАТМІРА1933, была выше, чем в контрольной и в остальных опытных. Наиболее значительная разница по массе внутренних органов (сердце, печень, мышечный желудок, легкие и селезенки) птиц также наблюдалась между I опытной группой и контролем. Повышение содержания эритроцитов в крови (признак стимуляции органов гемопоэза), содержания аминокислот в сперме петухов, толщины скорлупы яиц кур-несушек и ряда биохимических маркеров интенсивности обмена веществ также было сильнее в группе I, нежели в группе III, которая получала смесь препаратов.

Если два использованных штамма работают как два разных «выключателя» одной программы, то их одновременное выключение не будет давать эффекта, превосходящего активацию выключателей по отдельности. В случае выключателей-метаболитов, их действие должно иметь дозозависимость. Очевидно, что смешивание полудоз двух разных выключателей будет давать такой же эффект как один из них в половинной дозе. Конечно, данное предположение является спекулятивным. Для его проверки необходимо получить зависимость доза-эффект, в более простой и быстро реализуемой модельной

системе, чем куры, а также идентифицировать вещества, ответственные за наблюдаемые феномены, что и будет предметом наших дальнейших исследований. Возможно наше предположение окажется полезным для постепенного приближения к будущей непротиворечивой теории старения.

Заключение.

1. Было продолжено лабораторное производство препаратов, необходимых для исследования эффектов пробиотических бактерий, по разработанной нами методике. Выход сухого препарата за одну выработку составил 750+50 г, содержание жизнеспособных клеток использованных штаммов составило 10^9 – 10^{10} КОЕ в одном грамме сухого препарата.

2. Была разработана тест-система на основе LUX-биосенсоров и препаратов платины – индукторов ускоренного старения, позволяющая проводить скрининг протекторных свойств ферментатов бацилл, предположительно связанных с геропротекторной активностью. Было установлено, что армированные штаммы не теряют своих протекторных свойств при колонизации кишечника птиц. Было показано, что как обычные, так и армированные штаммы проявляли антагонистическую активность к патогенным бактериям. Были проведены предварительные опыты по установлению химической природы действующего вещества в ферментатах, и было показано, что оно устойчиво к действию протеиназ, РНКаз и температуры.

3. В ходе изучения динамики характеристик и параметров микрофлоры ЖКТ, было установлено, что микрофлора птиц не изменялась в течение всего периода наблюдений. Бактерии р. *Bacillus* при стандартной дозировке полностью усваивались птицей и из экскрементов не выделялись.

4. Было осуществлено индивидуальное мечение птиц: в возрасте 15 недель подопытная птица, при переводе в цех родительского стада, была окольцована индивидуальными ножными бирками для более четкого учета за развитием и продуктивностью.

5. Мониторинг физиологических параметров опытных и контрольной групп птиц показал, что набор живой массы во всех опытных группах был выше, чем в контрольной. Масса яичника и длина яйцевода ремонтных молодых опытных групп достоверно превышала контроль. Наблюдалось также улучшение биохимических показателей крови, качества спермы петухов, яйценоскости кур-несушек, морфологических и биохимических параметров яиц. Одним из наиболее значимых

результатов можно назвать увеличение оплодотворенности яиц и снижение гибели эмбрионов в первые 7 суток инкубации.

6. Было выявлено снижение относительного числа повреждений (до 22 %) в митохондриальной ДНК одной из опытных групп по сравнению с контролем.

7. Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов и не содержат потенциальных генотоксинов и мутагенов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Churilov M.N., Mazanko M.S., Bren A.B., Volski A., Chikindas M.L. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. *Lett Appl Microbiol.*, 2015, 61(6): 549-554.
2. Grillari, J., Katinger, H., & Voglauer, R. (2007). Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic acids research*, 35(22), 7566-7576.
3. Brabec, V. and Leng, M. (1993) DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 5345–5349.
4. Jones, J.C., Zhen, W.P., Reed, E., Parker, R.J., Sancar, A. and Bohr, V.A. (1991) Gene-specific formation and repair of cisplatin intrastrand adducts and interstrand cross-links in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 266, 7101–7107.
5. Roberts, J.J. and Friedlos, F. (1987) Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity. *Pharmacol. Ther.*, 34, 215–246.
6. Ta, L. E., Espeset L., Podratz J., Windebank A.J. (2006) Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum–DNA binding. *Neurotoxicology*. 27(6), 992–1002.
7. Орлова Р.В. (2002) Новые лекарственные средства в лечении колоректального рака. *Практическая онкология*. 3(4), 273–281.
8. Чистяков В.А., Празднова Е.В., Гутникова Л.В., Сазыкина М.А., Сазыкин И.С. (2012) Супероксидустрояющая активность производного пластохинона - 10-(6'-пластохинонил)децил-трифенилфосфония (SkQ1). *Биохимия*. 77(7), 932-935.
9. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Sazykina M.A., Sazykin I.S. (2014) Study of Prooxidant Action of Ultraviolet Radiation with Wavelength 258 Nm Using Bacterial Biosensors. *MEJSR* 21(8), 1333–1340
10. Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Бельков А.П., Завильгельский Г.Б. (2008) Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с цисплатиной. *Микробиология*. 77(5), 590–597.

11. Miyajima A., Nakashima J., Yoshioka K., Tachibana M., Tazaki H., Murai M. (1997) Role of reactive oxygen species in cis–dichlorodiammineplatinum–induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer*. **76**(2), 206–210.
12. Laurent A., Nicco C., Chéreau C., Goulvestre C., Alexandre J., Alves A., Lévy E., Goldwasser F., Panis Y., Soubrane O., Weill B., Batteux F. (2005) Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer res*. **65**(3), 948–956.
13. Godwin A.K., Meister A., O'Dwyer P.J., Huang C.S., Hamilton T.C., Anderson M.E. (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(7), 3070–3074.
14. Giri A., Khyriam D., Prasad S.B. (1998) Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutat Res*. **421**(2), 139–148.
15. В. А. Чистяков, Е. В. Празднова, М. С. Мазанко, М. Н. Чурилов, В. К. Чмыхало Развитие резистентности к антибиотикам у бактерий при противоопухолевой терапии препаратами на основе платины //Молекулярная биология, 2018, №.2 – в печати
16. Di Cesare Mannelli L., Zanardelli M., Failli P., Ghelardini C. (2012) Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. *J Pain*. **13**(3), 276–284.
17. Poulsen LL, Thøfner I, Bisgaard M, Olsen RH, Christensen JP, Christensen H. Staphylococcus agnetis, a potential pathogen in broiler breeders // Vet Microbiol. – 2017. – 212. pp: 1-6.
18. Ogasawara F, Yamamoto Y, Sato Y, Fukunari K, Murata K, Yaegashi G, Goto M, Murakami R. Concurrent Fowlpox and Candidiasis Diseases in Backyard Chickens with Unusual Pox Lesions in the Bursa of Fabricius // Avian Dis. – 2016. - 60(3). pp: 705-708.
19. Younis G, Awad A, Mohamed N. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens // Vet World. – 2017. - 10(10). pp:1167-1172.
20. Yang B. W. et al. RNA-Seq Analysis of Antibiotic-Producing *Bacillus subtilis* SC-8 Reveals a Role for Small Peptides in Controlling PapR Signaling //Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2017. – С. 1-11.
21. He R. et al. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation //Food Research International. – 2012. – Т. 49. – №. 1. – С. 432-438.
22. Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных. Методические указания (рег. № 13-5-02/1043 от 11.05.2004)
23. Калашников, А.П., В.И. Фисинин, В.В. Щеглов Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. М., 2003.

24. Овсянников, А.И. Основы опытного дела в животноводстве. М.: Колос, 1976.
25. Викторов П. И., В. К. Менькин. Методика и организация зоотехнических. М.: Агропромиздат, 1991.
26. Методические указания по организации и проведению НИР. М, 2013 г.
27. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях. Министерство сельского хозяйства СССР. ВАСХНИЛ. Отделение ветеринарии. Москва, 1981.
28. Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под редакцией А.И. Карпищенко. Изд. ГЭОТАР-Медиа, 2012.
29. Khan S. H., Rehman A., Sardar R., Khawaja T. The effect of probiotic supplementation on the growth performance, blood biochemistry and immune response of reciprocal F1 crossbred (Rhode Island Red×Fayoumi) cockerels. *Journal of Applied Animal Research*, 2013, 41(4): 417-426.
30. Al-Saad S., Abbod M., Abo Yones A. Effects of some growth promoters on blood hematology and serum composition of broiler chickens. *Int J. Agric. Res*, 2014, 9: 265-270.
31. Rahman M. S., Mustari, A., Salauddin, M., Rahman, M. M. Effects of probiotics and enzymes on growth performance and haematobiochemical parameters in broilers. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 2014, 11(1): 111-118.
32. Cetin N., Guclu B.K., Cetin E. The effects of probiotic and mannanoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in Turkeys. *Journal of Veterinary Medicine Series A – Physiology Pathology Clinical Medicine*, 2005, 52: 263–267.
33. Abd El-Hack M. E. Mahgoub S. A., Alagawany M., Ashour E. A. Improving productive performance and mitigating harmful emissions from laying hen excreta via feeding on graded levels of corn DDGS with or without *Bacillus subtilis* probiotic. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 2016: 1-10.
34. Копыловская Г. Я., Новик И. Е. Воспроизведение и искусственное осеменение птицы //ГЯ Копыловская, ИЕ Новик. – 1975.
35. Куликов Д., Кудря Н., Романов Е., Никишов А. Характеристика яиц кур кросса «Ломанн браун» // Птицеводство. – 1997. – № 3. – С. 20-22.
36. Фисинин В.И., Агечкин А.П., Алексеев Ф.Ф., Ройтер Л.М., Столяр Т.А. [и др.]. Промышленное птицеводство / Сергиев Посад: ВНИТИП, 2005. – 599 с.

37. Царенко П., Васильева Д., Рыбалова Н. Качество яиц сегодня: хранение, инкубация // Птицеводство. – 1997. – № 3. – С. 9-11.
38. Sawthorn R. M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucleic Acids Research. – 2002. – Vol. 30. – № 10.
39. O’Callaghan N. J., Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length // Biological Procedures Online. – 2011. - V. 13.
40. Kim Y.J., Subramani V.K., Sohn S.H. Age Prediction in the Chickens Using Telomere Quantity by Quantitative Fluorescence In situ Hybridization Technique // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2011. – V. 24. - p. 603-609.
41. Sohn, S.H., Subramani V.K. Dynamics of Telomere Length in the Chicken // World's Poultry Science Journal. 2014. – V. 70. p. 721-735.
42. Santos J. H., Mandavilli B. S., Van Houten B. Measuring Oxidative mtDNA Damage and Repair Using Quantitative PCR // Methods in Molecular Biology. – 2002. – Vol. 197. – pp. 159-176.
43. Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – V.73. p. 451-455
44. Park E., Jeon G.I., Park J.S., Paik H.D. A Probiotic Strain of *Bacillus polyfermenticus* Reduces DMH Induced Precancerous Lesions in F344 Male Rat // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2007. – Vol. 30. – p. 569-574.
45. Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A. et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. Vol. 98. – p. 10469-10474.
46. Wang C., Jurk D., Maddick M., et al. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. // Aging Cell. - 2009 – Vol. 8. – p. 311-323.
47. Bohr V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – V. 32. – p. 804-812.
48. St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 27. – p. 44784-44790.
49. Sasaki T., Unno K., Tahara S. et. al. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds // Aging cell. – 2008. Vol. 7. – p. 459-469.
50. Skulachev V.P. How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers// IUBMB Life – 2005. – 57. – P. 305 – 310.

51. Скулачев В.П. Что такое «феноптоз» и как с ним бороться// Биохимия - 2012. – Т. 77. - В. 7. – С. 827 – 846.
52. Y.I. Pavlov, N.N. Khromov-Borisov, L.P. Shevchenko, L.A, Alekseyevitch and S.G. Inge-Vechtomov Comparisons of the promutagen-activating capacity of S9 liver preparations from mouse and chicken using in vitro tests with Salmonella and yeast// Mutation Research – 1984. – 140. – P. 75-79.
53. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса//Биотехнология. – 2009. - №6. - С. 16 – 25.
54. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Сазыкин И.С. Генотоксичность донных отложений р. Дон (2001-2007 гг.) // Водные ресурсы. - 2012. - Т. 39. - № 1. - С. 92-98.
55. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay // Mutat Res. - 2000. - Vol. 455(1-2). - P. 29-60.
56. Герхардт Ф. (ред) Методы общей бактериологии. - Том 2. - М.: Мир, 1983г. - С. 50-51.
57. Абилев С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии. – М.: СПб.: Нестор-История, 2015. - 304 с.
58. Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. (2004) The reliability-engineering approach to the problem of biological aging, Ann. NY Acad. Sci., 1019, 509-512.
59. Скулачев В.П. (2012) Что такое «феноптоз» и как с ним бороться, Биохимия, 77, 827-846.
60. Skulachev V.P. (2003) Aging and the programmed death phenomena. In: Topics in Current Genetics. Vol. 3. Nystrom T., Osiewacz H.D., editors. Model systems in ageing. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 191–238.
61. Цит. по: Северин Ф.Ф., Скулачев В.П. (2009) Запрограммированная клеточная смерть как мишень борьбы со старением организма, Успехи геронтол., 22, 37-48.