СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2022, том 57, № 6, с. 1147-1165

УДК 636.5.033:636.064.6:57.042:577.218 doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1147rus

ПРОДУКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ (*Gallus gallus* L.) КРОССА ROSS 308 ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИБИОТИКОВ, ГЛИФОСАТА И ШТАММА *Bacillus* sp.*

Д.Г. ТЮРИНА[1], Г.Ю. ЛАПТЕВ[2], Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ[1, 2, 3] ✉, Л.А. ИЛЬИНА[1, 2, 3], В.А. ФИЛИППОВА[1, 2, 3], Е.А. БРАЖНИК[1], Н.В. ТАРЛАВИН[1, 4], К.А. КАЛИТКИНА[1, 3], Е.С. ПОНОМАРЕВА[1], А.В. ДУБРОВИН[1], Н.И. НОВИКОВА[1], Д.А. АХМАТЧИН[1], В.В. МОЛОТКОВ[1], В.Х. МЕЛИКИДИ[1], Е.П. ГОРФУНКЕЛЬ[1]

Сочетание широкого использования антибиотиков и присутствия в кормах остаточных количеств пестицидов способно поставить под угрозу терапевтические и производственные эффекты от применения антибактериальных препаратов в промышленном птицеводстве. Происходящие при этом изменения могут сопровождаться модификацией экспрессии ряда генов. В настоящей работе впервые показано, что стимуляция мясной продуктивности цыплят-бройлеров кросса Ross 308 под влиянием ветеринарных антибиотиков энрофлоксацина и колистина, вероятно, имеет связь с индукцией экспрессии гена *MYOG*, который способствует развитию и дифференцировке мышц, генов антимикробной (*Gal9*, *Gal10*) и антивирусной (*IRF7*) защиты, а также провоспалительных генов *IL6*, *IL8* и *PTGS2*. Кроме того, впервые выявлено, что глифосат подавляет экспрессию антимикробных и антивирусных генов у цыплят-бройлеров. Наша цель заключалась в оценке продуктивности и изменения экспрессии генов, ассоциированных с иммунитетом, продуктивностью и устойчивостью к токсическим и лекарственным веществам, при воздействии антибиотиков, в том числе на фоне загрязнения кормов глифосатом и введения в рацион цыплят-бройлеров штамма *Bacillus* sp. Эксперименты проводили в 2022 году в виварии ООО «БИОТРОФ+» на бройлерах (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 от 1- до 35-суточного возраста. Для кормления с 1-х по 28-е сут использовали комбикорм ПК 5 для бройлеров, с 29-х по 35-е сут — ПК 6 для бройлеров. Птицу разделили на 4 группы по 40 гол. в каждой. Бройлеры в I группе (контроль) получали рацион без антибиотиков, глифосата и штамма микроорганизма; во II опытной — рацион с добавлением ветеринарных антибиотиков энрофлоксацина и колистина в виде препарата Энрофлон К (ООО «ВИК — здоровье животных», Россия) в дозировке 1 мл/л воды с 1-х по 5-е сут выращивания и флорфеникола (ООО «Агроветзащита С.-П. НВЦ», Россия) в дозировке 1 мл/л воды с 17-х по 20-е сут; в III опытной — рацион с добавлением препарата Энрофлон К по схеме, описанной выше, а также глифосата в составе препарата Агрокиллер (ЗАО Фирма «Август», Россия) в количестве 20 мг/кг корма, что соответствовало 1ПДК для продуктов питания; в IV опытной — рацион с добавлением энрофлоксацина, колистина, флорфеникола, глифосата, а также штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8, выделенного из кишечника бройлеров. Для анализа содержания глифосатов методом ИФА в кормах и питательных средах использовали стриповый иммуноферментный анализатор STAT FAX 303+ («Awareness Technology Co. LLC», США) и тест-систему Glyphosate ELISA, Microtiter Plate («Abraxis», США). В конце эксперимента у бройлеров отбирали ткани слепых отростков кишечника и грудных мышц. Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Тотальную РНК выделяли с использованием мини-набора Aurum™ Total RNA («Bio-Rad», США), следуя инструкциям производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили для получения кДНК на матрице РНК с использованием iScript™ Reverse Transcription Supermix («Bio-Rad», США). Для анализа экспрессии мРНК были выбраны специфические праймеры для генов интерлейкина 6 (*IL6*), интерлейкина 8 (*IL8*), синтеза регуляторного фактора интерферона 7 (*IRF7*), простагландин-эндопероксидсинтазы (*PTGS2*), синтеза β-дефензина 9 *AvBD9* (*Gal9*), β-дефензина 10 *AvBD10* (*Gal10*), инсулиноподобного фактора роста 1 (*LGF1*), миогенина (*MYOG*), миозенина (*MYOZ2*) и гена *GSTA3*, связанного с устойчивостью к токсическим и лекарственным веществам. ПЦР проводили с использованием амплификатора ДТлайт («ДНК-Технология», Россия) и набора SsoAdvancedTM Universal SYBR® Green Supermix («Bio-Rad», США). Живую массу бройлеров определяли в возрасте 7, 14, 21, 28 и 35 сут. Показано, что антибиотики стимулировали ($p \le 0,05$) продуктивность бройлеров с 14-х сут жизни до конца эксперимента на 4,8-23,3 % (II группа по сравнению с I группой). В конце эксперимента отмечали негативное влияние глифосата на продуктивность бройлеров (III группа по сравнению со II, $p \le 0,05$). Результаты оценки экспрессии генов бройлеров, связанных с ростом и формированием мышечных волокон, показали, что экспрессия гена *MYOG* была выше у бройлеров из II и IV групп соответственно в 2,0 и 2,1 раза по сравнению с I группой ($p \le 0,05$). В III группе количество мРНК

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-16-00128 «Изучение токсического действия глифосатов на функциональное состояние микробного сообщества кишечника птиц, их рост и развитие и разработка биопрепарата на основе штамма-деструктора глифосата».

гена *MYOG* не повышалось ($p > 0,05$), что свидетельствует о негативном влиянии глифосата на экспрессию генов продуктивности птицы. Глифосат (III группа) выступал и как супрессор экспрессии генов антимикробной и антивирусной защиты *Gal9*, *Gal10* и *IRF7* (по сравнению со II группой) ($p \leq 0,05$). Интродукция штамма микроорганизма в корм на фоне глифосата и антибиотиков (IV группа) вызывала усиление экспрессии *Gal9* по сравнению с наблюдаемой в III группе ($p \leq 0,05$). Прослеживалась тенденция резкого возрастания экспрессии провоспалительных генов *IL6*, *IL8* и *PTGS2* во II группе (соответственно в 4,6; 11,2 и 6,6 раза по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$). Введение в рацион антибиотиков также оказало некоторое стимулирующее воздействие на экспрессию гена *GSTA3* ($p \leq 0,05$). Таким образом, механизм положительного влияния антибиотиков на продуктивность бройлеров кросса Ross 308, вероятно, частично связан с тем, что антибиотики выступают в роли индукторов ряда важных генов. На фоне глифосатов эффект стимуляции продуктивности птицы снижался. Глифосаты оказывают воздействие, в том числе, через нарушение активности некоторых ключевых генов. Наблюдаемые позитивные изменения транскрипции ряда генов, включая гены антимикробной и антивирусной защиты, под влиянием штамма микроорганизма *Bacillus* sp., свидетельствуют о перспективности пробиотиков как инструмента сглаживания физиологического дисбаланса при применении лекарственных веществ и загрязнении корма токсическими веществами.

Ключевые слова: микотоксины, антибиотик, глифосат, бройлеры, экспрессия генов.

Антибиотики играют важную роль в борьбе с инфекционными заболеваниями, а также используются для стимуляции роста сельскохозяйственной птицы (1-3). Обычной практикой среди многих производителей мяса птицы считается метафилактическое введение антибиотиков, например энрофлоксацина, цыплятам в первые несколько суток жизни, а иногда и при дальнейшем выращивании (4, 5). Антибиотики могут негативно влиять на защитные механизмы птиц, которые определяются функционированием основных органов иммунной системы (6). Есть сведения, что, хотя энрофлоксацин ингибирует гуморальные иммунные механизмы (7), он может способствовать клеточному иммунному ответу у цыплят (5).

Интересно, что механизм стимуляции роста сельскохозяйственных животных и птицы под влиянием антибиотиков до сих пор не ясен. Все гипотезы сводятся в основном к модуляции состава микробиоты на их фоне (8). H. Eyssen с соавт. (9) предположили, что антибиотики стимулируют рост цыплят благодаря антибактериальному действию в отношении грамположительных микроорганизмов, препятствующих усвоению питательных веществ. По другой гипотезе (10), уменьшение популяции лактобацилл у животных, получавших антибиотики, снижает активность гидролазы солей желчных кислот, что увеличивает относительное обилие конъюгированных солей желчных кислот, способствует липидному обмену и синтезу энергии. В результате прирост массы животных повышается.

Тем не менее применение антибиотиков, как правило, негативно отражается на иммунитете (11). На свиньях (12) и на птице (13) показано, что диетические антибиотики могут вмешиваться в экспрессию генов.

Помимо антибиотиков, на показатели иммунитета, здоровья и продуктивности бройлеров влияют многие другие факторы (14). Так, в кормах для птиц, в особенности производимых на основе генетически модифицированной сои, присутствует значительное количество остатков гербицида глифосата (15, 16), которые могут оказывать негативное действие на организм (17, 18).

Пищеварительная система служит защитным барьером от воздействия пестицидов и патогенов (19, 20). Лимфоидные ткани в желудочно-кишечном тракте у птиц хорошо развиты (21, 22) и участвуют в активации иммунных реакций (23-25). При этом важно отметить, что исследование влияния глифосатов на экспрессию генов сельскохозяйственных животных и птицы ранее не проводили.

Широкое использование антибиотиков и присутствие в кормах гли-

фосатов может поставить под угрозу терапевтические и производственные эффекты от применения антибактериальных препаратов. Ранее было показано, что воздействие глифосатов увеличивало толерантность микроорганизмов *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* серовар Typhimurium к канамицину и цефалоспорину (26). Однако на животных-моделях совместное влияние антибиотиков и глифосатов ранее не изучалось.

Поиск средств, положительно влияющих на микробиоту кишечника птицы за счет стимуляции защитных механизмов и снижения потребности в профилактическом и терапевтическом применении антибиотиков, ведется в течение многих лет. Полезные штаммы микроорганизмов, несомненно, занимают первое место среди таких агентов (27-29) и находят широкое применение в кормлении сельскохозяйственной птицы (30). Нередко полезные бактерии применяются одновременно с антибиотиками для профилактики побочных эффектов последних (31). Доказано воздействие микроорганизмов на иммунитет (32) и экспрессию генов хозяина (33). Штаммы микроорганизмов-биодеструкторов использовали для профилактики при загрязнении кормов микотоксинами (34) и глифосатами (35). В этом отношении целесообразно исследовать, может ли интродукция штаммов микроорганизмов в рационы быть инструментом сглаживания иммуносупрессии, возникшей на фоне антибиотиков.

В настоящей работе впервые показано, что стимуляция мясной продуктивности цыплят-бройлеров кросса Ross 308 под влиянием ветеринарных антибиотиков энрофлоксацина и колистина, вероятно, имеет связь с индукцией экспрессии мРНК гена *MYOG*, который способствует развитию и дифференцировке мышц, генов антимикробной (*Gal9*, *Gal10*) и антивирусной (*IRF7*) защиты, а также провоспалительных генов *IL6*, *IL8* и *PTGS2*. Кроме того, впервые показано, что глифосат подавляет экспрессию антимикробных и антивирусных генов у цыплят-бройлеров.

Нашей целью было оценить продуктивность и изменение экспрессии генов, ассоциированных с иммунитетом, продуктивностью и устойчивостью к токсическим и лекарственным веществам, у цыплят-бройлеров при воздействии антибиотиков, в том числе на фоне загрязнения кормов глифосатом и введения в рацион штамма *Bacillus* sp.

Методика. Опыты проводили в 2022 году в виварии ООО «БИОТРОФ+» на бройлерах (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 от 1- до 35-суточного возраста; соблюдались требования Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986) (36). Условия кормления и содержания соответствовали рекомендациям для кросса (37). С 1-х по 28-е сут выращивания применяли комбикорм ПК 5 для бройлеров, с 29-х по 35-е сут — ПК 6 для бройлеров.

Птицу разделили на 4 группы по 40 гол. в каждой. В I интактной группе (контроль) бройлеры получали рацион без введения антибиотиков, глифосата и штамма микроорганизма; во II опытной — рацион с добавлением ветеринарных антибиотиков энрофлоксацина и колистина в виде препарата Энрофлон К (ООО «ВИК — здоровье животных», Россия) в дозировке 1 мл/л воды с 1-х по 5-е сут выращивания и флорфеникола (ООО «Агроветзащита С.-П. НВЦ», Россия) с 17-х по 20-е сут в дозировке 1 мл/л воды; в III опытной — рацион с добавлением препарата Энрофлон К по схеме, описанной выше, а также глифосата в количестве 20 мг/кг корма, что соответствовало 1ПДК для продуктов питания (38); в IV опытной — рацион с добавлением энрофлоксацина, колистина, флорфеникола, глифосата, а также

штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8. Бактериальный препарат использовали в концентрации 10^6 клеток/кг корма.

Для анализа способности осуществлять биодеструкцию глифосата in vitro 11 штаммов *Bacillus* sp. инкубировали с глифосатом в виде гербицида Торнадо, ВР (ЗАО Фирма «Август», Россия), содержащего глифосат N-(фосфонометил)-глицин (изопропиламинная соль) (360 г/л), в течение 2 сут. Препарат вносили в среду в количестве 20 мкл, что соответствовало 144 мг/л чистого глифосата. Штаммы культивировали на полусинтетической питательной среде (меласса — 2 %; NaCl — 0,02 %; K_2HPO_4 — 0,2 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05 %; $CaCO_3$ — 0,01 %) в стеклянных колбах с ватными пробками на шейкере при скорости вращения 230 об/мин и температуре 32±1,2 °С без дополнительного аэрирования. Концентрация бактерий в начале культивирования во всех вариантах — $1{,}0\times10^4$ клеток/мл, длительность культивирования — 2 сут. Концентрация бактерий по окончании культивирования составляла от $1{,}9\times10^7\pm7{,}9\times10^5$ до $8{,}7\times10^8\pm6{,}3\times10^6$ клеток/мл. Уменьшение содержания микотоксинов в питательной среде с инокулированной культурой живых бактериальных клеток по сравнению с контролем условно считали биодеструкцией глифосата.

Штамм *Bacillus* sp. ГЛ-8, выделенный из кишечника бройлеров, был получен из коллекции ООО «БИОТРОФ+». Штамм представлял собой аэробные неподвижные спорообразующие палочки шириной 1,2-1,5 мкм и длиной 2-5 мкм. Он образовывал эллиптические споры центрального расположения. Для получения предварительных выводов о том, что штамм *Bacillus* sp. ГЛ-8 не имеет факторов вирулентности и этиологической значимости в развитии инфекционных процессов, определяли его гемолитическую активность. Ее устанавливали через 24 ч при просмотре колоний, выросших на 5 % кровяном агаре.

В производственном эксперименте применяли глифосат в составе препарата Агрокиллер (ЗАО Фирма «Август», Россия), содержащего 500 г/л глифосата (изопропиламинная соль). Для этого из препарата Агрокиллер готовили рабочий раствор, который наносили на комбикорм посредством распыления в соотношении 5 мл рабочего раствора на 1 кг комбикорма, до конечного содержания чистого глифосата в комбикорме 20 мг/кг. Смешивание осуществляли механическим способом с соблюдением требований безопасности персонала. Потребление корма бройлерами составляло в среднем 150 г/сут, то есть бройлеры опытных групп ежесуточно получали глифосат в количестве 3 мг/птицу. После внесения глифосата его концентрацию в корме контролировали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Рацион бройлеров практически не содержал фоновых количеств глифосата, что свидетельствует о чистоте эксперимента.

Для анализа содержания глифосатов методом ИФА в кормах и питательных средах использовали стриповый иммуноферментный анализатор STAT FAX 303+ («Awareness Technology Co LLC», США) и тест-систему Glyphosate ELISA, Microtiter Plate («Abraxis», США). Тест основан на прямой конкурентной иммуноферментной реакции между глифосатом, который присутствует в образце, и ферментом, маркированным глифосатом, для связывания антител кролика к глифосату и антител козы к иммуноглобулинам кролика, иммобилизованных в микролунках. После проведения иммуноферментной реакции интенсивность цветового сигнала раствора в лунках была обратно пропорциональна концентрации глифосата, присутствующего в образцах.

Для определения экспрессии генов в конце эксперимента у бройлеров отбирали ткани слепых отростков кишечника и грудных мышц. Образцы стабилизировали с помощью реагента RNAlater («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США) и незамедлительно отправляли в молекулярно-генетическую лабораторию научно-производственной компании ООО «БИОТРОФ+» для выделения РНК.

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР. Для получения РНК ткани смешивали с жидким азотом и гомогенизировали. Тотальную РНК выделяли с использованием мини-набора Aurum™ Total RNA («Bio-Rad», США), следуя инструкциям производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили для получения кДНК на матрице РНК с использованием iScript™ Reverse Transcription Supermix («Bio-Rad», США) (39). Следующие специфические праймеры были подобраны с помощью инструментария NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) для анализа экспрессии:

Ген, его продукт	Последовательность праймеров (5′→3′)
IL6, интерлейкин 6	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC
	R: TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT
IL8, интерлейкин 8	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGA
	R: TAACATGAGGCACCGATGTG
IRF7, регуляторный фактор интерферона 7	F: ATCCCTTGGAAGCACAACGCC
	R: CTGAGGCAACCGCGTAGACCTT
PTGS2, простагландин-эндопероксидсинтаза 2	F: TCGAGATCACACTTGATTGACA
	R: TTTGTGCCTTGTGGGTCAG
AvBD9 (*Gal9*), β-дефензин 9	F: AACACCGTCAGGCATCTTCACA
	R: CGTCTTCTTGGCTGTAAGCTGGA
AvBD10 (*Gal10*), β-дефензин 10	F: GCTCTTCGCTGTTCTCCTCT
	R: CCAGAGATGGTGAAGGTG
LGF1, инсулиноподобный фактор роста 1	F: GCTGCCGGCCCAGAA
	R: ACGAACTGAAGAGCATCAACCA
MYOG , миогенин	F: GGAGAAGCGGAGGCTGAAG
	R: GCAGAGTGCTGCGTTTCAGA
MYOZ2, миозенин ()	F: CAACACTCAGCAACAGAGGC
	R: GTATGGGCTCTCCACGATTTCT
GSTA3, ген, связанный с устойчивостью к токсическим и лекарственным веществам	F: TACATCGCAGGGAAATACA
	R: GGAGAGAAAGGAAACACCA

В качестве референсного контроля использовали праймеры для амплификации гена «домашнего хозяйства», кодирующего белок бета-актин ACTB: F — 5′-CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA-3′, R — 5′-ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG-3′ (40). Реакцию проводили с использованием амплификатора ДТлайт («ДНК-Технология», Россия) и набора SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix («Bio-Rad», США) в соответствии с протоколом производителя (41). Режим и условия амплификации были следующими: 5 мин при 95 °С (предварительный прогрев); 30 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 70 °С (40 циклов) (42). Относительную экспрессию оценивали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (43). Живую массу бройлеров определяли в возрасте 7, 14, 21, 28 и 35 сут (44).

Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли методом многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программах Microsoft Excel XP/2003, R-Studio (Version 1.1.453) (https://rstudio.com). Результаты представлены как средние значения (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM). Достоверность различий устанавливали по *t*-критерию Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$. Средние значения сравнивали с использованием теста достоверно значимой разницы Тьюки (HSD) и функции TukeyHSD в пакете R Stats Package (https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/TukeyHSD).

Результаты. У 6 из 11 исследованных штаммов *Bacillus* sp. мы выявили способность к биодеструкции глифосата in vitro, наиболее выражен-

ную у штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8 по сравнению с другими (53,0±4,10 %) (табл.). Этот факт позволяет предположить присутствие в составе культуральной жидкости *Bacillus* sp. ГЛ-8 ферментов, связанных с биодеструкцией ксенобиотиков. При исследовании ГЛ-8 на наличие гемолитической активности на кровяном агаре мы не наблюдали зон просветления вокруг колоний.

Полученные данные могут иметь важное практическое значение для использования штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8 в качестве пробиотика в популяциях сельскохозяйственной птицы, подвергающейся воздействию глифосатов. Доказано, что многие бактерии способны метаболизировать глифосат до нетоксичных соединений. Его биодеградация приводит к образованию метаболитов, которые используются в качестве источника углерода, азота и фосфора — элементов, необходимых для развития организмов (45).

Биодеструкция глифосата под влиянием штаммов *Bacillus* sp. из коллекции ООО «БИОТРОФ+» (n = 3, M±SEM; опыт in vitro, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург, 2022 год)

Наименование штамма	Биодеструкция, %
Bacillus sp. ГЛ-1	15,4±2,40
Bacillus sp. ГЛ-2	0
Bacillus sp. ГЛ-3	19,2±3,90
Bacillus sp. ГЛ-4	6,3±0,52
Bacillus sp. ГЛ-5	0
Bacillus sp. ГЛ-6	0
Bacillus sp. ГЛ-7	0
Bacillus sp. ГЛ-8	53,0±4,10
Bacillus sp. ГЛ-9	0
Bacillus sp. ГЛ-10	13,9±2,30
Bacillus sp. ГЛ-11	25,6±2,40

Бактериальное разложение глифосата происходит по двум метаболическим путям. Первый путь осуществляется при участии фермента глифосатоксидоредуктазы, расщепляющей молекулу глифосата на два метаболита: глиоксилат, который вступает в цикл трикарбоновых кислот и в результате полного окисления образует диоксид углерода, и аминометилфосфоновую кислоту, которая с помощью фермента углерод-фосфорная лиаза (C-P-лиаза) гидролизуется до фосфата и метиламина. Последний превращается в аммиак (прямой источник азота) и формальдегид, который вступает в тетрагидрофолатный цикл. Второй путь деградации включает фермент C-P-лиазу, которая за счет своей гидролитической активности образует фосфат и саркозин. На следующем этапе, благодаря активности фермента саркозиноксидазы, саркозин превращается в аминокислоту глицин, которая используется непосредственно для метаболизма и микробного биосинтеза, и формальдегид, который вводится в тетрагидрофолатный цикл (46). Показано, что *Arthrobacter* sp. GLP-1, *Alcaligenes* sp. GL, *Pseudomonas pseudomallei* 22 и *Flavobacterium* sp. GD1 используют глифосат в качестве источника фосфора (47). Пробиотические штаммы микроорганизмов давно применяют в качестве биодеструкторов токсичных соединений в кишечнике (48, 49). Тем не менее нельзя исключить, что в нашем эксперименте определенная доля или весь объем глифосата мог подвергаться не биодеструкции, а сорбции. Поэтому для окончательных выводов требуются более расширенные и детальные исследования.

Согласно анализу прироста живой массы птицы, антибиотики стимулировали ($p \leq 0,05$) продуктивность с 14-х сут жизни до конца эксперимента на 4,8-23,3 % (II группа по сравнению с I группой) (рис. 1). Увеличение прироста живой массы бройлеров под влиянием антибиотиков известно давно (8). В конце эксперимента на фоне антибиотиков проявилось

негативное воздействие глифосата на продуктивность бройлеров (III группа по сравнению со II группой) ($p \leq 0,05$). Это также представляется закономерным, поскольку, во-первых, глифосат может вызывать внутриклеточные изменения и цитотоксичность (18). Известно, что глифосаты влияют на активность митохондрий и, вероятно, усиливают повреждение ДНК (17). Во-вторых, на тканевом и организменном уровнях глифосаты способны нарушать функцию нейротрансмиттера и, вероятно, действовать как эндокринные разрушители (50). Недавние исследования на моделях млекопитающих показали изменение содержания гормонов (51), нарушение полового созревания и репродукции (52). В-третьих, глифосаты могут воздействовать на организмы через изменения в микробных сообществах: шикиматный путь присутствует у большинства бактерий, причем у многих из них его ключевой фермент — энолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза (EPSPS) чувствителен к глифосату (53, 54). Недавно было обнаружено, что глифосаты негативно влияют на кишечные бактериальные сообщества у нескольких модельных организмов, а также в культурах in vitro (55-57).

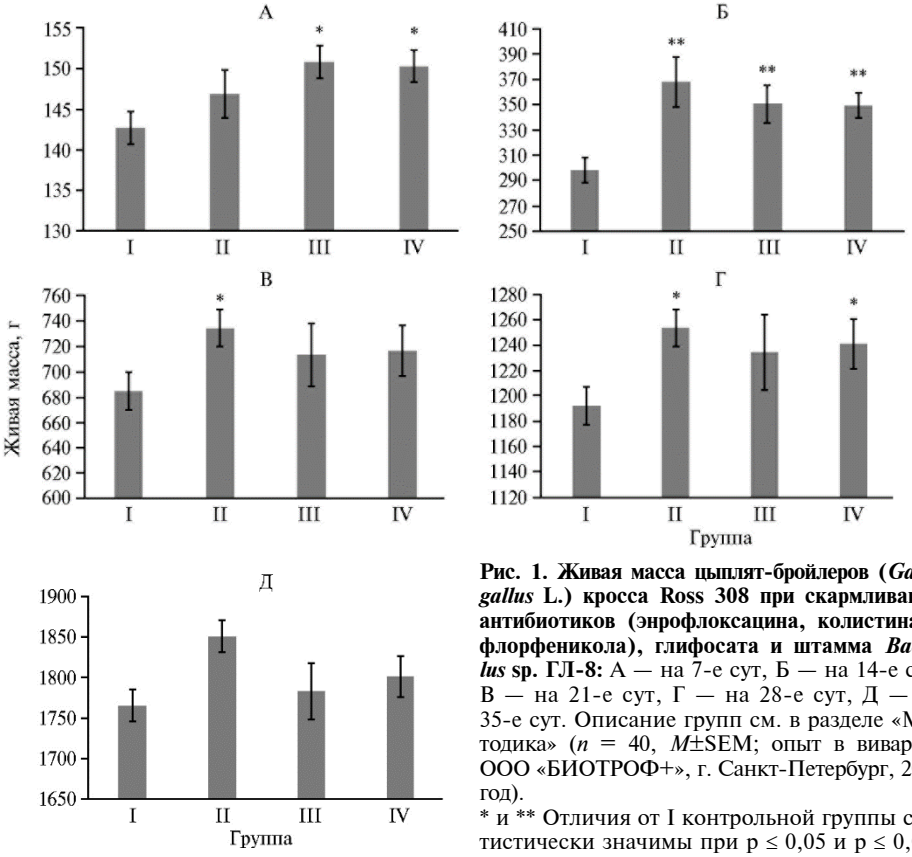

Рис. 1. Живая масса цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 при скармливании антибиотиков (энрофлоксацина, колистина и флорфеникола), глифосата и штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8: А — на 7-е сут, Б — на 14-е сут, В — на 21-е сут, Г — на 28-е сут, Д — на 35-е сут. Описание групп см. в разделе «Методика» (n = 40, M±SEM; опыт в виварии, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург, 2022 год).
* и ** Отличия от I контрольной группы статистически значимы при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

Применение *Bacillus* sp. ГЛ-8 в сочетании с антибиотиками и глифосатом не оказало статистически значимого эффекта на продуктивность бройлеров (см. рис. 1). Это может быть связано с различными причинами, в частности с негативным влиянием антибиотиков на выживаемость и экспрессию генов у штамма микроорганизма-биодеструктора.

В связи с выявленными различиями в продуктивности бройлеров мы провели анализ экспрессии генов, связанных с ростом и формированием мышечных волокон, в ответ на введение в рационы антибиотиков, гли-

фосата и штамма микроорганизма-биодеструктора. Наиболее значительные изменения касались гена *MYOG*, который способствует развитию и дифференцировке мышц. Экспрессия мРНК гена *MYOG* была выше во II и IV группах соответственно в 2,0 и 2,1 раза по сравнению с I группой ($p \le 0,05$) (рис. 2).

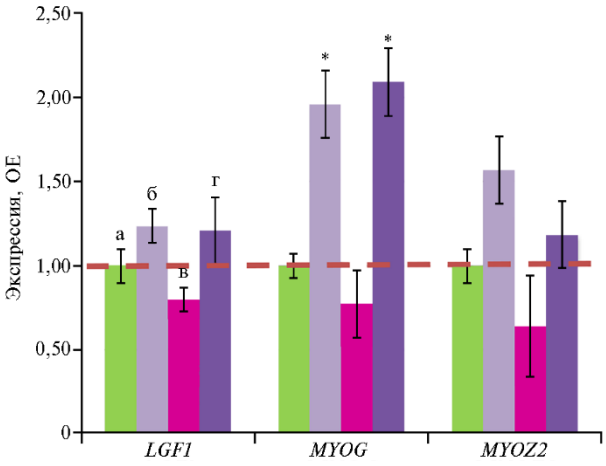

Рис. 2. Экспрессия мРНК генов *LGF1, MYOG* и *MYOZ2*, связанных с ростом и формированием мышечных волокон, в грудных мышцах цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 в ответ на скармливание антибиотиков (энрофлоксацина, колистина и флорфеникола), глифосата и штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8: а — I группа, б — II группа, в — III группа, г — IV группа. ОЕ — кратность изменений экспрессии по сравнению с I контрольной группой, в которой экспрессия принята за 1 (прерывистая красная линия — экспрессия в контроле). Описание групп см. в разделе «Методика» (данные получены на 35-е сут эксперимента; $n = 3$, $M \pm$ SEM; опыт в виварии, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург, 2022 год).
* Отличия от I контрольной группы статистически значимы при $p \le 0,05$ и $p \le 0,01$.

Ген *MYOG* (миогенин) — ключевой регуляторный фактор транскрипции, участвующий в развитии мышц во время миогенеза (58). Есть также данные о роли *MYOG* и после завершения миогенеза. Например, сообщалось о положительной взаимосвязи между увеличением массы грудных мышц и повышением экспрессии мРНК *MYOG* у 38-суточных бройлеров (59). Известно, что миогенин играет важную роль в поддержании митохондриальной активности при изнурительных физических нагрузках (60).

Мы полагаем, что повышенная экспрессия *MYOG* в нашем эксперименте играла определенную роль в увеличении живой массы бройлеров в варианте с антибиотиком. Хотя функции *MYOG* прежде всего связывают с индукцией миогенеза, этот ген также вносит вклад в энергетический метаболизм птиц. Повышенная транскрипционная активность *MYOG* во II и IV опытных группах могла быть фактором, способствующим усилению митохондриальной функции и повышенному накоплению энергии. В III группе активацию экспрессии *MYOG* не отмечали ($p > 0,05$), что свидетельствует о негативном влиянии глифосата на экспрессию генов продуктивности птиц. В целом полученные данные свидетельствовали о некотором сглаживании негативного эффекта глифосата при интродукции штамма микроорганизма.

В экспрессии генов *LGF1* (инсулиноподобный фактор роста 1) и *MYOZ2* (миозенин) различий между группами мы не обнаружили ($p > 0,05$).

С введением антибиотиков во II группе усилилась экспрессия антимикробных и антивирусных генов *Gal9*, *Gal10* и *IRF7* соответственно в 2,6; 10,5 и 40,8 раза по сравнению с контролем ($p \le 0,05$) (рис. 3). *Gal9* (*AvBD9*) и *Gal10* (*AvBD10*) — это гены, связанные с синтезом β-дефензинов птиц (61). Дефензины способствуют адаптивному иммунитету посредством селективного рекрутирования моноцитов, Т-лимфоцитов, незрелых дендритных и тучных клеток в очаги инфекции (62, 63). Эти вещества повышают устойчивость птицы в отношении многих патогенов, включая *Klebsiella*

pneumonia, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* (64). Ген *IRF7*, в свою очередь, связан с синтезом регуляторного фактора интерферона 7 — члена семейства регуляторных факторов транскрипции интерферона (65). Благодаря своей ключевой роли в иммунитете *IRF7* участвует в повышении устойчивости макроорганизма ко многим вирусам с помощью различных стратегий (66). Мы предполагаем, что экспрессия генов, связанных с антимикробной и антивирусной защитой, могла модулироваться как непосредственно антибиотиками, так и измененной под их влиянием просветной микробиотой, обитающей в слепой кишке бройлеров.

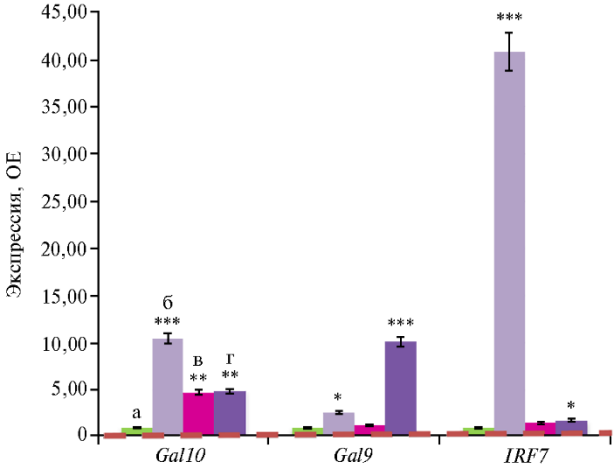

Рис. 3. Экспрессия мРНК генов антимикробной и антивирусной защиты *Gal9*, *Gal10* и *IRF7* в слепых отростках кишечника цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 в ответ на скармливание антибиотиков (энрофлоксацина, колистина и флорфеникола), глифосата и штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8: а — I группа, б — II группа, в — III группа, г — IV группа. ОЕ — кратность изменений экспрессии по сравнению с I контрольной группой, в которой экспрессия принята за 1 (прерывистая красная линия — экспрессия в контроле). Описание групп см. в разделе «Методика» (данные получены на 35-е сут эксперимента; $n = 3$, $M \pm SEM$; опыт в виварии, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург, 2022 год).

*, ** и *** Отличия от I контрольной группы статистически значимы соответственно при $p \le 0,05$; $p \le 0,01$ и $p \le 0,001$.

Увеличение экспрессии описанных генов также способно внести вклад в повышение живой массы бройлеров на фоне антибиотиков в связи с возможным снижением патогенной нагрузки. Ранее T. Terada с соавт. (67) исследовали влияние введения в рацион антибиотиков (пенициллина и стрептомицина) на экспрессию генов в слепой кишке цыплят-бройлеров. Было показано, что на 7-е сут экспрессия *AvBD1* и *AvBD2* снижалась. Тем не менее на 14-е сут в группе, получавшей антибиотики, экспрессия *TLR21* (толл-подобный рецептор, участвующий в антимикробной защите) и генов антимикробных пептидов увеличивалась по сравнению с контролем. В другом исследовании (11) на цыплятах 6-суточного возраста, получавших энрофлоксацин в течение первых 5 сут жизни, антибиотик не оказывал подавляющего действия на субпопуляцию лимфоцитов.

В нашем эксперименте глифосат на фоне антибиотиков (III группа) выступал как супрессор экспрессии *Gal9*, *Gal10* и *IRF7* по сравнению со II группой ($p \le 0,05$). Снижение экспрессии генов *Gal9* и *IRF7* в III группе соответствовало показателям контроля без антибиотиков ($p > 0,05$). Полученные данные могут указывать на то, что глифосат, присутствующий в кормах даже на уровне 1ПДК, негативно воздействует на иммунную систему, одновременно снижая терапевтические и зоотехнические эффекты антибиотиков. Этим может частично объясняться негативное действие глифосата на продуктивность бройлеров в конце эксперимента. Ранее подобные данные были получены при использовании хлорорганического пестицида дильдрина на крысах (68). Обработка дофаминергических нейрональных клеток дильдрином достоверно снижала экспрессию многих генов, включая гены

противовирусного ответа (*IFN*) (68).

Добавление *Bacillus* sp. ГЛ-8 в корма на фоне глифосата и антибиотиков (IV группа) привело к усилению экспрессии *Gal9* по сравнению с III группой (введение глифосата на фоне антибиотиков без штамма микроорганизма) ($p \le 0,05$). Такие результаты могут свидетельствовать об определенной перспективе снижения негативного воздействия глифосата на механизмы противомикробной и противовирусной защиты при использовании микроорганизмов с полезными свойствами.

Как и для генов антимикробной и антивирусной защиты, прослеживалась тенденция к резкому возрастанию экспрессии провоспалительных генов *IL6, IL8* и *PTGS2* — соответственно в 4,6; 11,2 и 6,6 раза во II группе по сравнению с контролем ($p \le 0,05$), чем еще раз подтверждается воздействие антибиотиков на иммунные процессы (рис. 4).

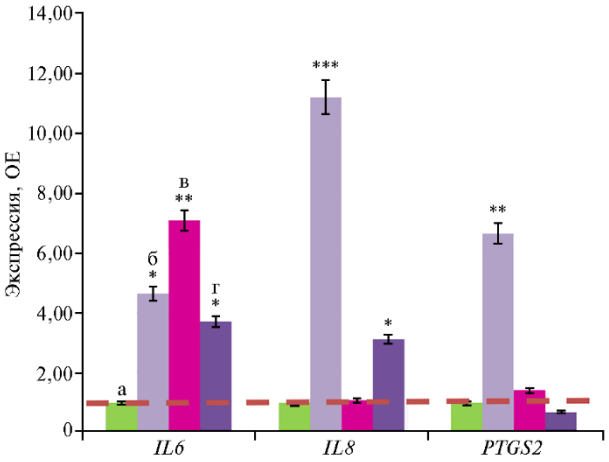

Рис. 4. Экспрессия мРНК провоспалительных генов *IL6, IL8* и *PTGS2* в слепых отростках кишечника цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 в ответ на скармливание антибиотиков (энрофлоксацина, колистина и флорфеникола), глифосата и штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8: а — I группа, б — II группа, в — III группа, г — IV группа. ОЕ — кратность изменений экспрессии по сравнению с I контрольной группой, в которой экспрессия принята за 1 (прерывистая красная линия — экспрессия в контроле). Описание групп см. в разделе «Методика» (данные получены на 35-е сут эксперимента; $n = 3$, $M \pm SEM$; опыт в виварии, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург, 2022 год).

*, ** и *** Отличия от I контрольной группы статистически значимы при $p \le 0,05$, $p \le 0,01$ и $p \le 0,001$.

Интересно, что фторхинолоны, к которым относится и использованный в нашем эксперименте энрофлоксацин, влияют на экспрессию генов многих цитокинов (69). Отмечено, что большинство производных фторхинолона супериндуцируют синтез интерлейкина 2 in vitro, но при этом ингибируют синтез интерлейкина 1. Усиление экспрессии провоспалительных генов при скармливании антибиотика может иметь различные последствия для здоровья. С одной стороны, интерлейкины (в том числе *IL6*, *IL8*) служат частью важных врожденных защитных иммунных ответов, привлекая к месту инфекции дополнительные лейкоциты, которые повышают сопротивление эпителиальных клеток (70, 71). С другой стороны, гиперпродукция провоспалительных цитокинов вовлечена в патогенез целого ряда заболеваний человека, включая COVID-19 (72), а также имеет связь со снижением продуктивности сельскохозяйственных животных (73). Доказано (74, 75), что введение препаратов на основе цитокинов здоровым животным провоцировало нежелательные симптомы. Активация провоспалительных цитокинов тесно связана с экспрессией гена *PTGS2*, поскольку цитокины способны ее индуцировать (76). Ген *PTGS2* связан с синтезом эндопероксидсинтазы простагландинов (циклооксигеназы 2), которая катализирует окислительное превращение арахидоновой кислоты в простагландин. Простагландин впоследствии метаболизируется до различных биологически

активных метаболитов, таких как простациклин и тромбоксан А2, принимая участие как в местных, так и в системных воспалительных реакциях (77).

В нашем эксперименте действие глифосата, добавленного в корма, на провоспалительные гены проявилось по-разному. Так, экспрессия *IL6* усилилась в III группе по сравнению со II ($p \leq 0,05$), а экспрессия *IL8* и *PTGS2* снизилась ($p \leq 0,05$). О том, что пестициды в большинстве случаев служат индукторами экспрессии *IL6*, сообщалось в большинстве ранее опубликованных исследований. Так, хроническое воздействие на крыс дихлорвосом (фосфорорганическим инсектицидом) вызывает активацию микроглии с индукцией НАДФН-оксидазы и провоспалительных цитокинов, включая TNF-α, IL-1β и IL6 (78). Y. Zhang с соавт. (79) продемонстрировали повышение содержания малонового диальдегида и IL6 в мышцах крыс, подвергшихся воздействию ометоата — инсектицида, широко используемого в развивающихся странах. Авторы пришли к выводу, что ометоат может вызывать резистентность к инсулину. Кроме того, перекрестное исследование показало, что фермеры, оказавшиеся под воздействием фосфорорганических пестицидов в силу профессиональной деятельности, подвержены развитию диабета (79). Цитокины, продуцируемые жировой тканью, например TNF-α и IL6, контролируют секрецию С-реактивного белка из печени (80, 81). Стимуляция этого воспалительного механизма, по-видимому, служит триггером резистентности к инсулину в периферических тканях (82).

Применение микроорганизма-биодеструктора позитивно повлияло на экспрессию провоспалительных генов. Так, экспрессия *IL6* снизилась в IV группе по сравнению с III, а *IL8*, напротив, повысилась ($p \leq 0,05$). Действительно, некоторые полезные бактерии, ферментируя пищевые волокна, образуют короткоцепочечные жирные кислоты, в частности ацетат, пропионат и бутират, которые поглощаются клетками кишечника и используются в качестве источника энергии для их метаболизма (83). Было показано, что короткоцепочечные жирные кислоты, например бутират, ингибируют продукцию NO и снижают экспрессию генов цитокинов, таких как *IL-1β, IL6, IFN-γ* и *IL-10* (84).

Введение в рацион бройлеров антибиотиков оказало некоторое стимулирующее действие на экспрессию гена *GSTA3* ($p \leq 0,05$) (рис. 5). Интересно, что добавление в рацион глифосата на фоне антибиотиков не изменяло экспрессию этого гена по сравнению с таковой во II группе ($p > 0,05$). Полученные результаты представляются вполне закономерными. Ген *GSTA3* связан с синтезом глутатион-S-трансферазы — фермента, отвечающего за противодействие организма канцерогенам, терапевтическим препаратам, токсинам окружающей среды и продуктам окислительного стресса (85). Этот фермент катализируют нуклеофильное улавливание ксенобиотиков глутатионом, который нейтрализует свободные радикалы из-за высокой электронодонорной способности его сульфидрильной (−SH) группы и предотвращает повреждение важных клеточных компонентов, тем самым участвуя в клеточной защите от токсических веществ. Глутатион-S-трансфераза в изобилии присутствует в печени, желудочно-кишечном тракте, легких и почках (85). Общеизвестно, что кумарин, этоксикин, афлатоксин B_1 и другие соединения, такие как фенольные антиоксиданты и изотиоцианаты, действуют как индукторы ферментов ксенобиотического метаболизма (86-88). Вероятно, в нашем эксперименте антибиотики выступали в роли индукторов гена *GSTA3*, будучи чужеродными для организма веществами.

Штамм *Bacillus* sp. ГЛ-8 оказал позитивное воздействие на экспрессию *GSTA3* (IV группа по сравнению с III) ($p \leq 0,05$): она снизилась до

контрольных значений. Ранее сообщалось, что кишечная микробиота может влиять на синтез ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, в толстой кишке и печени. Самые высокие концентрации ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, наблюдаются у безмикробных животных (89). Возможно, эффект от интродукции микроорганизма был связан с уменьшением токсической нагрузки под влиянием антибиотиков.

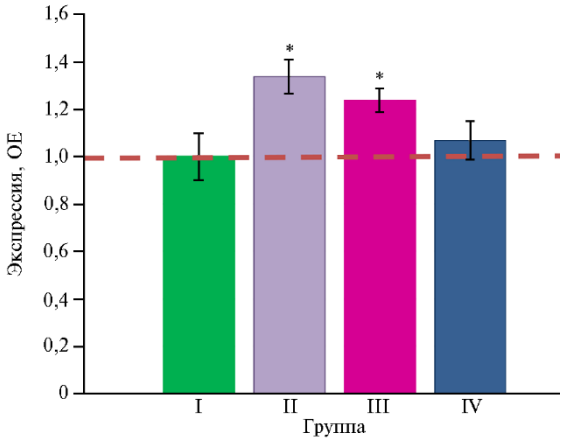

Рис. 5. Экспрессия мРНК гена *GSTA3*, связанного с устойчивостью к токсическим и лекарственным веществам, в слепых отростках кишечника цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Ross 308 в ответ на скармливание антибиотиков (энрофлоксацина, колистина и флорфеникола), глифосата и штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8. ОЕ — кратность изменений экспрессии по сравнению с I контрольной группой, в которой экспрессия принята за 1 (прерывистая красная линия — экспрессия в контроле). Описание групп см. в разделе «Методика» (данные получены на 35-е сут эксперимента; $n = 3$, $M \pm SEM$; опыт в виварии, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург, 2022 год).

* Отличия от I контрольной группы статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что информация о клеточных и молекулярных процессах, посредством которых антибиотики улучшают рост животных, ограничена, а предложенные гипотезы сводятся в основном к возможности модуляции микрофлоры. Вместе с тем понимание биологического механизма действия антибиотиков на стимуляцию роста сельскохозяйственных животных и птицы необходимо для создания эффективных альтернатив антибактериальным препаратам. Разрабатываемые средства должны обладать сходной стимулирующей активностью, но позволят избежать проблем возникновения устойчивости к противомикробным агентам.

В представленном исследовании мы выявили позитивное влияние антибиотиков на показатели продуктивности бройлеров, что соответствовало уровню экспрессии ряда генов, в частности связанных с развитием и дифференцировкой мышц. По всей вероятности, механизм позитивного действия антибиотиков на продуктивность частично связан с тем, что они выступают в роли индукторов ряда важных генов.

На практике сельскохозяйственная птица подвергается воздействию не только лекарственных веществ, но и токсикантов, содержащихся в кормах, в частности остаточных количеств пестицидов. Последствия для здоровья, возникающие в результате синергетического действия антибиотиков и пестицидов, непредсказуемы. В нашем эксперименте на фоне глифосатов, вносимых в количестве, соответствующем 1ПДК, у бройлеров наблюдалось снижение эффекта стимуляции продуктивности под влиянием антибиотиков. Мы показали, что воздействие глифосатов происходит, в том числе, через нарушение активности некоторых ключевых генов птицы. Полученные данные указывают на необходимость привлечения внимания к проблеме содержания глифосатов в кормах для птицы и уточнения границ ПДК глифосатов в кормах.

Штамм *Bacillus* sp. ГЛ-8, проявляющий свойства биодеструктора in

vitro, не способствовал достоверному улучшению показателей роста у цыплят-бройлеров при экспериментальном загрязнении кормов глифосатами. Это свидетельствует о необходимости селекции микроорганизмов с учетом комплекса свойств, включая выживаемость в желудочно-кишечном тракте, адгезию и другие пробиотические характеристики. Тем не менее наблюдаемые позитивные изменения в транскрипции ряда генов, включая гены антимикробной и антивирусной защиты, под влиянием штамма микроорганизма-биодеструктора указывают на перспективность использования пробиотиков как инструмента смягчения физиологического дисбаланса на фоне применения лекарственных веществ и загрязнения корма токсическими веществами. В дальнейшем представляет интерес точная видовая идентификация и изучение других важных пробиотических свойств и технологических характеристик штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8, например его устойчивости к антибиотикам и лекарственным препаратам, применяемым для кормления сельскохозяйственной птицы.

В настоящем исследовании представлены результаты сложного многокомпонентного эксперимента, в котором мы использовали три различные по действию и назначению добавки в кормах цыплят-бройлеров (антибиотики, пестицид, штамм *Bacillus* sp.). Безусловно, это усложняет интерпретацию результатов. Например, бактериальный штамм мог оказать воздействие на продуктивность и экспрессию некоторых генов у птиц вне зависимости от введения антибиотиков, а антибиотики, в свою очередь, могли препятствовать колонизации кишечника птицы этим штаммом. В последующих экспериментах важно установить точное влияние бактериальных штаммов-деструкторов на продуктивность и экспрессию некоторых генов у птицы, а также прямой эффект, оказываемый антибиотиками на способность штаммов-деструкторов колонизировать кишечник птицы. Также представляет интерес изучение колонизации кишечника штаммами пробиотических микроорганизмов.

Итак, из 11 изученных штаммов бацилл наиболее выраженной способностью к биодеструкции глифосата (53,0±4,10 %) обладал штамм *Bacillus* sp. ГЛ-8. Антибиотики энрофлоксацин, колистин и флорфеникол стимулировали прирост живой массы у цыплят-бройлеров кросса Ross 308 с 14-х сут жизни до конца эксперимента на 4,8-23,3 %. К завершению эксперимента проявилось негативное влияние глифосата на продуктивность бройлеров на фоне антибиотиков. Экспрессия мРНК гена *MYOG*, который способствует развитию и дифференцировке мышц, была выше у бройлеров, получавших антибиотики отдельно или в сочетании с *Bacillus* sp. ГЛ-8 — соответственно в 2,0 и 2,1 раза по сравнению с контролем. При добавлении в корма глифосата на фоне антибиотика без интродукции штамма микроорганизма-биодеструктора изменений экспрессии гена *MYOG* не отмечали. При введении антибиотиков усилилась экспрессия генов антимикробной (*Gal9, Gal10*) и антивирусной (*IRF7*) защиты — соответственно в 2,6; 10,5 и 40,8 раза по сравнению с контролем. При этом глифосат подавлял экспрессию антимикробных и антивирусных генов. В то же время при интродукции штамма *Bacillus* sp. ГЛ-8 в корма на фоне глифосата и антибиотиков экспрессия *Gal9* повышалась. По аналогии с генами антимикробной и антивирусной защиты у провоспалительных генов *IL6, IL8* и *PTGS2* прослеживалась тенденция резкого возрастания экспрессии (соответственно в 4,6; 11,2 и 6,6 раза) в вариантах с применением антибиотиков. Введение в рацион антибиотиков также оказало некоторое стимулирующее воздействие на экс-

прессию гена *GSTA3*, связанного с устойчивостью к токсическим и лекарственным веществам.

[1]*ООО «БИОТРОФ»,*
196602 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ул. Малиновская, 8, лит. А, пом. 7-Н,
e-mail: tiurina@biotrof.ru, deniz@biotrof.ru ✉, ilina@biotrof.ru, filippova@biotrof.ru vetdoktor@biotrof.ru, kate@biotrof.ru, dubrovin@biotrof.ru, novikova@biotrof.ru, da@biotrof.ru, molotkov@biotrof.ru, veronika@biotrof.ru, elena@biotrof.ru;
[2]*ООО «БИОТРОФ+»,*
192284 Россия, г. Санкт-Петербург, Загребский б-р, 19, корп. 1,
e-mail: georg-laptev@rambler.ru;
[3]*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,*
196601 Россия, г. Санкт-Петербург, Петербургское ш., 2,
e-mail: kseniya.k.a@biotrof.ru;
[4]*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины,*
196084 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5,
e-mail: tarlav1995@bk.ru

Поступила в редакцию 5 августа 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2022, V. 57, № 6, pp. 1147-1165

INFLUENCE OF ANTIBIOTICS, GLYPHOSATE AND A *Bacillus* sp. STRAIN ON PRODUCTIVITY PERFORMANCE AND GENE EXPRESSION IN CROSS ROSS 308 BROILER CHICKENS (*Gallus gallus* L.)

D.G. Tyurina[1], G.Yu. Laptev[2], E.A. Yildirim[1, 2, 3] ✉, L.A. Ilyina[1, 2, 3], V.A. Filippova[1, 2, 3], E.A. Brazhnik[1], N.V. Tarlavin[1, 4], K.A. Kalitkina[1, 3], E.S. Ponomareva[1], A.V. Dubrovin[1], N.I. Novikova[1], D.A. Akhmatchin[1], V.V. Molotkov[1], V.Kh. Melikidi[1], E.P. Gorfunkel[1]

[1]*JSC Biotrof*, 8, lit. A/7-H, ul. Malinovskaya, St. Petersburg—Pushkin, 196602 Russia, e-mail tiurina@biotrof.ru, deniz@biotrof.ru (✉ corresponding author), ilina@biotrof.ru, filippova@biotrof.ru vetdoktor@biotrof.ru, kate@biotrof.ru, dubrovin@biotrof.ru, novikova@biotrof.ru, da@biotrof.ru, molotkov@biotrof.ru, veronika@biotrof.ru, elena@biotrof.ru;
[2]*JSC Biotrof+,* 19, korp. 1, Zagrebskii bulv., St. Petersburg, 192284 Russia, e-mail georg-laptev@rambler.ru;
[3]*Saint Petersburg State Agrarian University,* 2, Peterburgskoe sh., St. Petersburg—Pushkin, 196601 Russia, e-mail kseniya.k.a@biotrof.ru;
[4]*Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine*, 5, ul. Chernigovskaya, St. Petersburg, 196084 Russia, e-mail tarlav1995@bk.ru
ORCID:
Tyurina D.G. orcid.org/0000-0001-9001-2432
Laptev G.Yu. orcid.org/0000-0002-8795-6659
Yildirim E.A. orcid.org/0000-0002-5846-4844
Ilyina L.A. orcid.org/0000-0003-2490-6942
Filippova V.A. orcid.org/0000-0001-8789-9837
Brazhnik E.A. orcid.org/0000-0003-2178-9330
Tarlavin N.V. orcid.org/0000-0002-6474-9171
Kalitkina K.A. orcid.org/0000-0002-9541-6839
Ponomareva E.S. orcid.org/0000-0002-4336-8273
Dubrovin A.V. orcid.org/0000-0001-8424-4114
Novikova N.I. orcid.org/0000-0002-9647-4184
Akhmatchin D.A. orcid.org/0000-0002-5264-1753
Molotkov V.V. orcid.org/0000-0002-6196-6226
Melikidi V.Kh. orcid.org/0000-0002-2883-3974
Gorfunkel E.P. orcid.org/ 0000-0002-6843-8733

The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 22-16-00128 "Investigation of the toxic effect of glyphosates on the functional state of the bird intestinal microbial community, their growth and development, and the development of a biological product based on the glyphosate degrading strain"
Received August 5, 2022
doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1147eng

Abstract

The combination of antibiotics and pesticide residues can compromise the therapeutic and production benefits of antibiotics in the poultry industry. These effects may be reflected in changes of gene expression. The present work, for the first time, shows that the stimulation of poultry meat productivity with veterinary antibiotics enrofloxacin and colistin is probably associated with the induced expression of *MYOG* gene which is known to promote the development and differentiation of muscles, genes of antimicrobial (*Gal9*, *Gal10*) and antiviral (*IRF7*) protection, and pro-inflammatory genes *IL6*, *IL8* and *PTGS2*. In addition, it was shown for the first time that glyphosate suppresses the expression of antimicrobial and antiviral genes in broilers of the Ross 308 cross. The aim of the study was to evaluate the change in the expression spectrum of key genes in broiler fed antibiotics, glyphosate and

a biodestructor strain. The experiments were carried out on broilers of the Ross 308 cross from 1 to 35 days of age (the vivarium of BIOTROF^{+} LLC, 2022). The broilers were divided into 4 groups of 40 birds each. Group I (control) was fed a diet without additives, group II received a diet with the addition of veterinary antibiotics enrofloxacin and colistin; group III experienced dietary antibiotics and glyphosate; group IV received dietary antibiotics, glyphosate and a strain of the microorganism-biodestructor *Bacillus* sp. GL-8. Glyphosate content was measured by ELISA using a STAT FAX 303+ analyzer (Awareness Technology, LLC, USA) and a Glyphosate ELISA Microtiter Plate test system (Abraxis, USA). Reverse transcription quantitative PCR was performed to evaluate gene expression of the caecum and pectoral muscle tissues. Total RNA was isolated from samples using the Aurum™ Total RNA mini kit (Bio-Rad, Hercules, USA). Specific primers were selected for immunity genes *IL6* (interleukin 6), *IL8* (interleukin 8), *IRF7* (interferon regulatory factor7), *PTGS2* (prostaglandin-endoperoxide synthase), *AvBD9* (*Gal9*) (β-defensin 9), *AvBD10* (*Gal10*) (β-биотро,bjnhdefensin 10). For productivity genes, *LGF-I* (insulin-like growth factor 1), *MYOG* (myogenin), *MYOZ2* (myosenin) and *GSTA3* associated with resistance to toxic and medicinal substances were tested. Amplification reactions were carried out using SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) using a DTlight amplifier (DNA-Technology, Russia). The body weight of broilers was assessed at 7, 14, 21, 28 and 35 days of age. Mathematical and statistical data processing was performed using multivariate analysis of variance in Microsoft Excel XP/2003, R-Studio (Version 1.1.453) (https://rstudio.com). The results showed a 4.8-23.3 %-stimulated productivity ($p \leq 0.05$) of broilers from 14 days of life until the end of the experiment due to dietary antibiotics (group II vs. group I). At the end of the experiment, a negative effect of glyphosate on broiler productivity occurred (group III vs. group II, $p \leq 0.05$). In broilers of groups II and IV, the expression of *MYOG* gene was 2.0 and 2.1 times higher than in group I ($p \leq 0.05$). In the group fed glyphosate combined with antibiotics without a biodestructor strain added (group III), no activation of the *MYOG* gene expression occurred compared to group I ($p > 0.05$), which indicates a negative effect of glyphosate on the expression of productivity genes. Glyphosate (group III) also acted as a suppressor of the antimicrobial and antiviral genes *Gal9*, *Gal10* and *IRF7* as compared to group II ($p \leq 0.05$). The dietary biodestructor strain co-fed with glyphosate and antibiotics (group IV) provided an increase in *Gal9* expression compared to group III ($p \leq 0.05$). There was a tendency for a sharp increase in the expression of pro-inflammatory genes *IL6*, *IL8* and *PTGS2* (by 4.6, 11.2 and 6.6 times, respectively) in group II fed antibiotics vs. control group I ($p \leq 0.05$). Our findings once again confirms the effect of antibiotics on immune processes. For *GSTA3* gene associated with resistance to toxic and medicinal substances, it was shown that the introduction of antibiotics into feeds had some stimulating effect on the level of *GSTA3* gene expression in the caeca tissues of broilers (group II vs. group I, $p \leq 0.05$). Thus, the mechanism providing positive effects of antibiotics on productivity performance is probably partly due to the fact that they act as inducers of a set of important genes. Glyphosates fed in an amount corresponding to 1MPC reduced the stimulating effect of antibiotics. Glyphosates act, among other things, through the disruption of the activity of some key bird genes. The positive dynamics of the expression of various genes, including those involved in antimicrobial and antiviral defense, under the action of a biodestructor strain indicates the prospects for using probiotics as a means of smoothing out physiological imbalances caused by drugs and food contamination with toxic substances.

Keywords: mycotoxins, antibiotic, glyphosate, broilers, gene expression.

REFERENCES

1. Danzeisen J.L., Clayton J.B., Huang H., Knights D., McComb B., Hayer S.S., Johnson T.J. Temporal relationships exist between cecum, ileum, and litter bacterial microbiomes in a commercial turkey flock, and subtherapeutic penicillin treatment impacts ileum bacterial community establishment. *Frontiers in Environmental Science*, 2015, 2: 56 (doi: 10.3389/fvets.2015.00056).
2. Pourabedin M., Guan L., Zhao X. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome*, 2015, 3(1): 15 (doi: 10.1186/s40168-015-0079-4).
3. Bohaychuk V.M., Gensler G.E., King R.K., Manninen K.I., Sorensen O., Wu J.T., Stiles M.E., McMullen L.M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(9): 2176-2182 (doi: 10.4315/0362-028x-69.9.2176).
4. Chrząstek K., Wieliczko A. The influence of enrofloxacin, florfenicol, ceftiofur and *E. coli* LPS interaction on T and B cells subset in chicks. *Veterinary Research Communications*, 2015, 39(1): 53-60 (doi: 10.1007/s11259-015-9632-7).
5. Khalifeh M.S., Amawi M.M., Abu-Basha E.A., Yonis I.B. Assessment of humoral and cellular-mediated immune response in chickens treated with tilmicosin, florfenicol, or enrofloxacin at the time of Newcastle disease vaccination. *Poultry Science*, 2009, 88(10): 2118-2124 (doi: 10.3382/ps.2009-00215).

6. Ellakany H.F., Abu El-Azm I.M., Bekhit A.A., Shehawy M.M. Studies on the effects of enrofloxacin overdose on different health parameters in broiler chickens. *Journal of Veterinary Medical Research*, 2008, 18(1): 176-186 (doi: 10.21608/jvmr.2008.77869).
7. Tokarzewski S. Influence of enrofloxacin and chloramphenicol on the level of IgY in serum and egg yolk after immunostimulation of hens with *Salmonella enteritidis* antigens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2002, 5(3): 151-158.
8. Mehdi Y., Létourneau-Montminy M.P., Gaucher M.L., Chorfi Y., Suresh G., Rouissi T., Brar S.K., Côté C., Ramirez A.A., Godbout S. Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 2018, 4(2): 170-178 (doi: 10.1016/j.aninu.2018.03.002).
9. Eyssen H., de Somer P. The mode of action of antibiotics in stimulating growth of chicks. *Journal of Experimental Medicine*, 1963, 117(1): 127-38 (doi: 10.1084/jem.117.1.127).
10. Lin J., Hunkapiller A.A., Layton A.C., Chang Y.J., Robbins K.R. Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in chickens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2013, 10(4): 331-337 (doi: 10.1089/fpd.2012.1348).
11. Jankowski J., Tykałowski B., Stępniowska A., Konieczka P., Koncicki A., Matusevičius P., Ognik K. Immune parameters in chickens treated with antibiotics and probiotics during early life. *Animals (Basel)*, 2022, 12(9): 1133 (doi: 10.3390/ani12091133).
12. Yu M., Mu C., Yang Y., Zhang C., Su Y., Huang Z., Yu K., Zhu W. Increases in circulating amino acids with in-feed antibiotics correlated with gene expression of intestinal amino acid transporters in piglets. *Amino Acids*, 2017, 49(9): 1587-1599 (doi: 10.1007/s00726-017-2451-0).
13. Lu P., Choi J., Yang C., Mogire M., Liu S., Lahaye L., Adewole D., Rodas-Gonzalez A., Yang C. Effects of antibiotic growth promoter and dietary protease on growth performance, apparent ileal digestibility, intestinal morphology, meat quality, and intestinal gene expression in broiler chickens: a comparison. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(9): skaa254 (doi: 10.1093/jas/skaa254).
14. Tallentire C.W., Leinonen I., Kyriazakis I. Breeding for efficiency in the broiler chicken: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2016, 36(4): 66 (doi: 10.1007/s13593-016-0398-2).
15. Cuhra M., Bøhn T., Cuhra P. Glyphosate: Too much of a good thing? *Frontiers in Environment Science*, 2016, 4: e28 (doi: 10.3389/fenvs.2016.00028).
16. Xu J., Smith S., Smith G., Wang W., Li Y. Glyphosate contamination in grains and foods: an overview. *Food Control*, 2019, 106(12): 106710 (doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106710).
17. Tarazona J.V., Court-Marques D., Tiramani M., Reich H., Pfeil R., Istace F., Crivellente F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology*, 2017, 91(11): 2723-2743 (doi: 10.1007/s00204-017-1962-5).
18. Székács A., Darvas B. Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science*, 2018, 6: 35 (doi: 10.3389/fenvs.2018.00078).
19. Oswald I.P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Veterinary Research*, 2006, 37(3): 359-368 (doi: 10.1051/vetres:2006006).
20. Nochi T., Jansen C.A., Toyomizu M., van Eden W. The well-developed mucosal immune systems of birds and mammals allow for similar approaches of mucosal vaccination in both types of animals. *Frontiers in Nutrition*, 2018, 5: 60 (doi: 10.3389/fnut.2018.00060).
21. Casteleyn C., Doom M., Lambrechts E., Van den Broeck W., Simoens P., Cornillie P. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. *Avian Pathology*, 2010, 39(3): 143-150 (doi: 10.1080/03079451003786105).
22. Bar-Shira E., Sklan D., Friedman A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27(2): 147-157 (doi: 10.1016/s0145-305x(02)00076-9).
23. Goitsuka R., Chen C.-L.H., Benyon L., Asano Y., Kitamura D., Cooper M.D. Chicken cathelicidin-B1, an antimicrobial guardian at the mucosal M cell gateway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(38): 15063-15068 (doi: 10.1073/pnas.0707037104).
24. Nile C.J., Townes C.L., Michailidis G., Hirst B.H., Hall J. Identification of chicken lysozyme g2 and its expression in the intestine. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, 61(21): 2760-2766 (doi: 10.1007/s00018-004-4345-z).
25. Cuperus T., van Dijk A., Dwars R.M., Haagsman H.P. Localization and developmental expression of two chicken host defense peptides: cathelicidin-2 and avian β-defensin 9. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 61: 48-59 (doi: 10.1016/j.dci.2016.03.008).
26. Kurenbach B., Marjoshi D., Amábile-Cuevas C.F., Ferguson G.C., Godsoe W., Gibson P., Heinemann J.A. Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in Escherichia coli and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, 2015, 6(2): e00009-15 (doi: 10.1128/mBio.00009-15).
27. Ognik K., Konieczka P., Stępniowska A., Jankowski J. Oxidative and epigenetic changes and gut permeability response in early-treated chickens with antibiotic or probiotic. *Animals*, 2020, 10(12): 2204 (doi: 10.3390/ani10122204).
28. Krauze M., Abramowicz K., Ognik K. The effect of addition of probiotic bacteria (*Bacillus subtilis* or *Enterococcus faecium)* or phytobiotic containing cinnamon oil to drinking water on the health

and performance of broiler. *Annals of Animal Science*, 2020, 20: 191-205 (doi: 10.2478/aoas-2019-0059).
29. Abramowicz K., Krauze M., Ognik K. Use of *Bacillus subtilis* PB6 enriched with choline to improve growth performance, immune status, histological parameters and intestinal microbiota of broiler chickens. *Animal Production Science*, 2020, 60(5): 625-634 (doi: 10.1071/AN18737).
30. Chen Y., Wen C., Zhou Y. Dietary synbiotic incorporation as an alternative to antibiotic improves growth performance, intestinal morphology, immunity and antioxidant capacity of broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(9): 3343-3350 (doi: 10.1002/jsfa.8838).
31. Łukasik J., Guo Q., Boulos L., Szajewska H., Johnston B.C. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated adverse events in children-A scoping review to inform development of a core outcome set. *PLoS ONE*, 2020, 15(5): e0228824 (doi: 10.1371/journal.pone.0228824).
32. Cheng G., Hao H., Xie S., Wang X., Dai M., Huang L., Yuan Z. Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 217 (doi: 10.3389/fmicb.2014.00217).
33. Nichols R.G., Davenport E.R. The relationship between the gut microbiome and host gene expression: a review. *Human Genetics*, 2021, 140(5): 747-760 (doi: 10.1007/s00439-020-02237-0).
34. Rashidi N., Khatibjoo A., Taherpour K., Akbari-Gharaei M., Shirzadi H. Effects of licorice extract, probiotic, toxin binder and poultry litter biochar on performance, immune function, blood indices and liver histopathology of broilers exposed to aflatoxin-B1. *Poultry Science*, 2020, 99(11): 5896-5906 (doi: 10.1016/j.psj.2020.08.034).
35. Firdous S., Iqbal S., Anwar S. Optimization and modeling of glyphosate biodegradation by a novel *Comamonas odontotermitis* P2 through response surface methodology. *Pedosphere*, 2017, 30(5): 618-627 (doi: 10.1016/S1002-0160(17)60381-3).
36. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* (ETS № 123) (Strasburg, 18.03.1986).
37. Egorov I.A., Manukyan V.A., Lenkova T.N., Okolelova T.M., Lukashenko V.S. *Metodika provedeniya nauchnykh i proizvodstvennykh issledovaniy po kormleniyu sel'skokhozyaystvennoy ptitsy. Molekulyarno-geneticheskie metody opredeleniya mikroflory kishechnika* /Pod redaktsiey V.I. Fisinina [Methodology for scientific and practical research on feeding poultry. Molecular genetic methods for determining the intestinal microflora. V.I. Fisinin (ed.)]. Sergiev Posad, 2013 (in Russ.).
38. *SanPiN 1.2.3685-21. Gigienicheskie normativy i trebovaniya k obespecheniyu bezopasnosti i (ili) bezvrednosti dlya cheloveka faktorov sredy obitaniya* [SanPiN 1.2.3685-21. Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans] (in Russ.).
39. Zeka F., Vanderheyden K., De Smet E., Cuvelier C.A., Mestdagh P., Vandesompele J. Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21418 (doi: 10.1038/srep21418).
40. Yue H., Lei X.W., Yang F.L., Li M.Y., Tang C. Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. *Virol. Sin.*, 2010, 25(6): 425-431 (doi: 10.1007/s12250-010-3114-4).
41. Meza Cerda M.I., Gray R., Higgins D.P. Cytokine RT-qPCR and ddPCR for immunological investigations of the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) and other mammals. *PeerJ*, 2020, 8: e10306 (doi: 10.7717/peerj.10306).
42. Laptev G.Y., Filippova V.A., Kochish I.I., Yildirim E.A., Ilina L.A., Dubrovin A.V., Brazhnik E.A., Novikova N.I., Novikova O.B., Dmitrieva M.E., Smolensky V.I., Surai P.F., Griffin D.K., Romanov M.N. Examination of the expression of immunity genes and bacterial profiles in the caecum of growing chickens infected with *Salmonella* enteritidis and fed a phytobiotic. *Animals*, 2019, 9(9): 615 (doi: 10.3390/ani9090615).
43. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408 (doi: 10.1006/meth.2001.1262).
44. Imangulov Sh.A., Egorov I.A., Okolelova T.M., Tishenkov A.N., Lenkova T.N., Pan'kov P.N., Ezerskaya A.V., Ignatova G.V., Dogadaeva I.V., Avdonin B.F., Petrina Z.A., Borisova T.V., Gromova T.I. *Metodika provedeniya nauchnykh i proizvodstvennykh issledovaniy po kormleniyu sel'skokhozyaystvennoy ptitsy: rekomendatsii* /Pod redaktsiey V.I. Fisinina, Sh.A. Imangulova [Methodology for scientific and practical research on feeding poultry: recommendations. V.I. Fisinin, Sh.A. Imangulov (eds.)]. Sergiev Posad, 2004 (in Russ.).
45. Hove-Jensen B., Zechel D.L., Jochimsen B. Utilization of glyphosate as phosphate source: Biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2014, 78(1): 176-197 (doi: 10.1128/MMBR.00040-13).
46. Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(12): 5033-5043 (doi: 10.1007/s00253-018-9035-0).
47. Balthazor T.M., Hallas L.E. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(2): 432-434 (doi: 10.1128/AEM.51.2.432-434.1986).
48. Średnicka P., Juszczuk-Kubiak E., Wójcicki M., Akimowicz M., Roszko M.Ł. Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: a review. *Food Chem. Toxicol.*, 2021, 153: 112306 (doi: 10.1016/j.fct.2021.112306).

49. Pop O.L., Suharoschi R., Gabbianelli R. Biodetoxification and protective properties of probiotics. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1278 (doi: 10.3390/microorganisms10071278).
50. Gill J.P.K., Sethi N., Mohan A., Datta S., Girdhar M. Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 2018, 16(10): 401-426 (doi: 10.1007/s10311-017-0689-0).
51. Manservisi F., Lesseur C., Panzacchi S., Mandrioli D., Falcioni L., Bua L., Manservigi M., Spinaci M., Galeati G., Mantovani A., Lorenzetti S., Miglio R., Andrade A.M., Kristensen D.M., Perry M.J., Swan S.H., Chen J., Belpoggi F. The Ramazzini Institute 13-week pilot study glyphosate-based herbicides administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on development and endocrine system. *Environmental Health*, 2019, 18(1): 15 (doi: 10.1186/s12940-019-0453-y).
52. Alarcón R., Ingaramo P.I., Rivera O.E., Dioguardi G.H., Repetti M.R., Demonte L.D., Milesi M.M., Varayoud J., Mucoz-de-Toro M., Luque E.H. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2019, 482: 45-56 (doi: 10.1016/j.mce.2018.12.007).
53. Van Bruggen A., He M.M., Shin K., Mai V., Jeong K.C., Finckh M.R., Morris J.G. Jr. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 2018, 616-617: 255-268 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.3090).
54. Leino L., Tall T., Helander M., Saloniemi I., Saikkonen K., Ruuskanen S., Puigbò P. Classification of glyphosate's target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase). *BioRxiv*, 2020, 408: 124556 (doi: 10.1101/2020.05.27.118265).
55. Aitbali Y., Ba-M'hamed S., Elhidar N., Nafis A., Soraa N., Bennis M. Glyphosate based-herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 2018, 67: 44-49 (doi: 10.1016/j.ntt.2018.04.002).
56. Motta E.V.S., Raymann K., Moran N.A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(41): 10305-10310 (doi: 10.1073/pnas.1803880115).
57. Mesnage R., Teixeira M., Mandrioli D., Falcioni L., Ducarmon Q.R., Zwittink R.D., Mazzacuva F., Caldwell A., Halket J., Amiel C., Panoff J.-M., Belpoggi F., Antoniou M.N. Use of shotgun metagenomics and metabolomics to evaluate the impact of glyphosate or roundup MON 52276 on the gut microbiota and serum metabolome of Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives*, 2021, 129(1): CID 017005 (doi: 10.1289/EHP6990).
58. Faralli H., Dilworth E.J. Turning on myogenin in muscle: a paradigm for understanding mechanisms of tissue-specific gene expression. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 2012: 836374 (doi: 10.1155/2012/836374).
59. Xiao Y., Wu C., Li K., Gui G., Zhang G., Yang H. Association of growth rate with hormone levels and myogenic gene expression profile in broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8: 43 (doi: 10.1186/s40104-017-0170-8).
60. Flynn J.E., Meadows E., Fiorotto M., Klein W.H. Myogenin regulates exercise capacity and skeletal muscle metabolism in the adult mouse. *PLoS ONE*, 2011, 5(10): e13535 (doi: 10.1371/journal.pone.0013535).
61. van Dijk A., Veldhuizen E.J.A., Haagsman H.P. Avian defensins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 124(1-2): 1-18 (doi: 10.1016/j.vetimm.2007.12.006).
62. Yang D., Chertov O., Bykovskaia S.N., Chen Q., Buffo M.J., Shogan J., Anderson M., Schröder J.M., Wang J.M., Howard O.M., Oppenheim J.J. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 1999, 286(5439): 525-528 (doi: 10.1126/science.286.5439.525).
63. Niyonsaba F., Iwabuchi K., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *International Immunology*, 2002, 14(4): 421-426 (doi: 10.1093/intimm/14.4.421).
64. Yacoub H.A., Elazzazy A.M., Abuzinadah O.A.H., Al-Hejin A.M., Mahmoud M.M., Harakeh S.M. Antimicrobial activities of chicken β-defensin (4 and 10) peptides against pathogenic bacteria and fungi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 36 (doi: 10.3389/fcimb.2015.00036).
65. Ning S., Pagano J.S., Barber G.N. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes and Immunity*, 2011, 12(6): 399-414 (doi: 10.1038/gene.2011.21).
66. Haller O., Kochs G., Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 2006, 344(1): 119-130 (doi: 10.1016/j.virol.2005.09.024).
67. Terada T., Nii T., Isobe N., Yoshimura Y. Effect of antibiotic treatment on microbial composition and expression of antimicrobial peptides and cytokines in the chick cecum. *Poultry Science*, 2020, 99(7): 3385-3392 (doi: 10.1016/j.psj.2020.03.016).
68. Russo M., Humes S.T., Figueroa A.M., Tagmount A., Zhang P., Loguinov A., Lednicky J.A., Sabo-Attwood T., Vulpe C.D., Liu B. Organochlorine pesticide dieldrin suppresses cellular interferon-related antiviral gene expression. *Toxicological Sciences*, 2021, 182(2): 260-274 (doi: 10.1093/toxsci/kfab064).
69. Dalhoff A., Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, 3(6): 359-371 (doi: 10.1016/S1473-3099(03)00658-3).

70. Moldawer L.L., Gelin J., Scherstén T., Lundholm K.G. Circulating interleukin 1 and tumor necrosis factor during inflammation. *The American Journal of Physiology*, 1987, 253(6): 922-928 (doi: 10.1152/ajpregu.1987.253.6.R922).
71. Cannon J.G., Tompkins R.G., Gelfand J.A., Michie H.R., Stanford G.G., van der Meer J.W., Endres S., Lonnemann G., Corsetti J., Chernow B., Wilmore D.W., Wolff S.M., Burke J.F., Dinarello C.A. Circulating IL-1 and TNF in septic shock and experimental endotoxin fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 1990, 161(1): 79-84 (doi: 10.1093/infdis/161.1.79).
72. Darif D., Hammi I., Kihel A., El Idrissi Saik I., Guessous F., Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microbial Pathogenesis*, 2021, 153: 104799 (doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799).
73. Broom L.J., Kogut M.H. Inflammation: friend or foe for animal production? *Poultry Science*, 2018, 97(2): 510-514 (doi: 10.3382/ps/pex314).
74. Tracey K.J., Wei H., Manogue K.R., Fong Y., Hesse D.G., Nguyen H.T., Kuo G.C., Beutler B., Cotran R.S., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 1988, 167(3): 1211-1227 (doi: 10.1084/jem.167.3.1211).
75. Fong Y., Moldawer L.L., Marano M., Wei H., Barber A., Manogue K., Tracey K.J., Kuo G. Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins. *The American Journal of Physiology*, 1989, 256(3): R659-R665 (doi: 10.1152/ajpregu.1989.256.3.R659).
76. Prescott S.M., Fitzpatrick F.A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1470(2): 69-78 (doi: 10.1016/s0304-419x(00)00006-8).
77. Thuresson E.D., Lakkides K.M., Rieke C.J., Sun Y., Wingerd B.A., Micielli R., Mulichak A.M., Malkowski M.G., Garavito R.M., Smith W.L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1: The functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid 210. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(13): 10347-10357 (doi: 10.1074/jbc.M009377200).
78. Binukumar B.K., Bal A., Gill K.D. Chronic dichlorvos exposure: microglial activation, proinflammatory cytokines and damage to nigrostriatal dopaminergic system. *Neuromolecular Medicine*, 2011, 13(4): 251-265 (doi: 10.1007/s12017-011-8156-8).
79. Zhang Y., Ren M., Li J., Wei Q., Ren Z., Lv J., Niu F., Ren S. Does omethoate have the potential to cause insulin resistance? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(1): 284-290 (doi: 10.1016/j.etap.2013.11.030).
80. Wellen K.E., Hotamisligil G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(5): 1111-1119 (doi: 10.1172/JCI25102).
81. Zhang K., Shen X., Wu J., Sakaki K., Saunders T., Rutkowski D.T., Back S.H., Kaufman R.J: Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 2006, 124(3): 587-599 (doi: 10.1016/j.cell.2005.11.040).
82. Yudkin J.S., Stehouwer C.D., Emeis J.J., Coppack S.W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999, 19(4): 972-978 (doi: 10.1161/01.atv.19.4.972).
83. Tan J., McKenzie C., Potamitis M., Thorburn A.N., Mackay C.R., Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*, 2014, 121: 91-119 (doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9).
84. Usami M., Kishimoto K., Ohata A., Miyoshi M., Aoyama M., Fueda Y., Kotani J. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor κB activation and tumor necrosis factor αα secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition Research*, 2008, 28(5): 321-328 (doi: 10.1016/j.nutres.2008.02.012).
85. Xu C., Li C.Y., Kong A.N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, 2005, 28(3): 249-268 (doi: 10.1007/BF02977789).
86. McLellan L.I., Judah D.J., Neal G.E., Hayes J.D. Regulation of aflatoxin B_1-metabolizing aldehyde reductase and glutathione S-transferase by chemoprotectors. *The Biochemical Journal*, 1994, 300(1): 117-124 (doi: 10.1042/bj3000117).
87. Kelly V.P., Ellis E.M., Manson M.M., Chanas S.A., Moffat G.J., McLeod R., Judah D.J., Neal G.E., Hayes J.D. Chemoprevention of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of aflatoxin B1-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Research*, 2000, 60(4): 957-969.
88. Murcia H.W., Diaz G.J. Protective effect of glutathione S-transferase enzyme activity against aflatoxin B1 in poultry species: relationship between glutathione S-transferase enzyme kinetic parameters, and resistance to aflatoxin B_1. *Poultry Science*, 2021, 100(8): 101235 (doi: 10.1016/j.psj.2021.101235).
89. Meinl W., Sczesny S., Brigelius-Flohé R., Blaut M., Glatt H. Impact of gut microbiota on intestinal and hepatic levels of phase 2 xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 2009, 37(6): 1179-1186 (doi: 10.1124/dmd.108.025916).