



## Модуляція цілісності кишкового бар'єру курчат-бройлерів, асоційована зі змінами мікробіому

Л. М. Тамчук, Д. М. Масюк  
dimasiuk@gmail.com



Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49009, Україна

### ORCID:

L. M. Tamchuk <https://orcid.org/0000-0002-3365-0443>  
D. M. Masiuk <https://orcid.org/0000-0002-2800-2580>

### Authors' Contributions:

**TLM:** Methodology; Investigation; Data curation; Formal analysis; Writing — original draft.

**MDM:** Project administration; Conceptualization; Methodology; Supervision; Formal analysis; Writing — review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

The authors declare that they have no financial conflicts of interest or personal relationships regarding this paper.

### Ethical approval:

All procedures with poultry were carried out in compliance with the requirements stated in the Law of Ukraine no. 3447-IV dated 21.02.06 "On the Protection of Animals from Cruelty", agreed with the main principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986), and approved by the Commission on Bioethics of Experiments on Animals of the Dnipro State Agrarian and Economic University.

### Acknowledgements:

The work was carried out with the support of the Ministry of Education and Science of Ukraine (grant no. 0122U001318, ID: 188187 05.11.2021).

Білки міжклітинної адгезії відіграють провідну роль у забезпеченні бар'єрної функції епітелію кишок, формуючи щільні міжклітинні з'єднання, які перешкоджають проникненню шкідливих речовин, мікроорганізмів і токсинів у внутрішнє середовище організму. Однак ефекти комплексного впливу коротколанцюгових жирних кислот з моногліцеридами (SCFA-M) на модуляцію адгезивних білків та їхній зв'язок зі станом мікробіому курчат-бройлерів залишаються нерозкритими, що обумовлює актуальність дослідження. Робота проведена на курчатах-бройлерах кросу *Cobb 500* в умовах промислової птахофабрики. Курчатам дослідної групи з питною водою випоювали препарат *C-3 C-10* у дозі 1%. Отримані результати показали, що задоволення курчат SCFA-M характеризується збільшенням експресії E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та зменшенням експресії IFN- $\gamma$  в дванадцятипалій кишці. Зокрема, задоволення SCFA-M курчатам збільшує рівень експресії E-cadherin у дванадцятипалій кишці на 25,8–30,4% ( $P \leq 0,001$ ), fibronectin — на 17,8–37,0% ( $P \leq 0,001$ ), IFN- $\alpha$  — на 21,0–71,6% ( $P \leq 0,001$ ), та зменшує експресію IFN- $\gamma$  на 13,5–49,9% ( $P \leq 0,01–0,001$ ) порівняно з показниками курчат контрольної групи. Встановлені взаємозв'язки експресії молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  і IFN- $\gamma$ ) в дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів, які протягом технологічного циклу істотно змінюються не тільки за силою, але і за напрямом. У 22-добових курчат-бройлерів вміст маркерів пов'язаний з вмістом *Escherichia coli* ( $r = 0,79–0,87$ ), у 29-добових курчат — з вмістом *E. coli* ( $r = -0,84 \dots -0,68$ ) та *Staphylococcus spp.* і *Enterococcus spp.* ( $r = 0,23–0,91$ ), а у 45-добових курчат — з вмістом *Staphylococcus spp.* ( $r = -0,83 \dots -0,51$ ). За дії SCFA-M у дванадцятипалій кишці 22-добових курчат встановлено сильні прямі зв'язки E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  зі *Staphylococcus spp.* ( $r = 0,81–0,91$ ); у 36-добових курчат-бройлерів експресія молекулярних маркерів має сильні обернені кореляційні зв'язки з вмістом *E. coli* ( $r = -0,92 \dots -0,80$ ). Таким чином, застосування SCFA-M курчатам-бройлерам має коригувальний вплив на модуляцію експресії молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів. Перспективи подальших досліджень полягають у розробленні схеми задоволення курчатам-бройлерам SCFA-M, які замінюють або мінімізують застосування антибактеріальних препаратів у птахівництві.

**Ключові слова:** курчата-бройлери, SCFA-M, мікробіом, E-кадгерин, фібронектин, інтерферон- $\alpha$ , інтерферон- $\gamma$



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

## Вступ

Тривалий час продуктивність промислової птиці забезпечували додаванням до корму низьких доз антибіотиків, що запобігало захворюванням та збільшувало приріст маси тіла [22]. Однак навіть за використання низьких доз антибіотиків проблеми зі здоров'ям птиці все одно виникали [1]. У промислового птахівництва застосування органічних кислот у кормах є найбільш перспективним для заміни антибактеріальних препаратів [12]. Зокрема, вже сьогодні успішно застосовують органічні кислоти з коротким, середнім та довгим ланцюгом, які здатні вибірково коригувати ріст або активність окремих бактерій [4]. Моногліцериди жирних кислот мають низку переваг, зокрема рН-незалежну антимікробну активність, та покращують бар'єрну функцію кишечника. Монолаурин проявляє виражений антибактеріальний та протизапальні ефекти [15].

Відомо, що білки міжклітинної адгезії відіграють провідну роль у забезпеченні бар'єрної функції епітелію кишок [14, 19]. Вони утворюють щільні міжклітинні з'єднання, які запобігають проникненню шкідливих речовин, мікроорганізмів і токсинів у внутрішнє середовище організму [23]. Дослідження на бройлерах і курках-несучках показали, що добавки з різними рівнями органічних кислот можуть стимулювати безліч генів, пов'язаних зі щільними контактами та імунною функцією [11]. Бутират покращує функцію кишкового бар'єру, збільшуючи транскрипцію claudin-1 через сприяння асоціації між SP1 і промотором claudin-1 [23]. Органічні кислоти, амінокислоти та пектини можуть впливати на модуляцію E-кадгерину. E-cadherin — це білок, який відіграє важливу роль у збереженні цілісності клітинних з'єднань в епітелії кишечника [3]. Зміни в експресії E-cadherin можуть впливати на клітинну адгезію, міграцію та інвазію, що має значення для процесів ремоделювання тканин, зокрема запалення та загоєння виразок [20]. Однак на сьогодні питання модуляції експресії E-cadherin, fibronectin, інтерферону- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) та інтерферону- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) у сліпій та дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів за впливу моногліцеридів опинилось поза увагою дослідників.

Тому актуальним напрямом наукових досліджень є встановлення впливу SCFA-M на стан бар'єрної функції кишечника, мікробіому та їхньої взаємодії в курчат-бройлерів, що дозволить розробити нові способи підвищення продуктивності і резистентності тварин з мінімізацією застосування антибіотиків.

## Матеріали і методи досліджень

Роботу провели на курчатах-бройлерах кросу Cobb 500 в умовах промислової птахофабрики. Для проведення дослідження було сформовано 2 групи курчат добового віку — дослідну (45000 курчат) та

контрольну (36000 курчат), які утримували в окремих ідентичних пташниках. Щільність посадки в контрольній групі склала в середньому 21 курча/м<sup>2</sup>. Бройлерів вирощували відповідно до стандартних протоколів підприємства за сучасними технологіями, впровадженими на підприємстві, з урахуванням та дотриманням основних вимог біологічної безпеки відповідно до робочих інструкцій з дотримання ветеринарно-санітарних правил. Птахам дослідної групи в періоди 16–18, 25–29 та 32–37 днів життя з водою випоювали препарат IP. Enterin C-3 C-10 у дозі 1,5 л/30 л води 1%. Склад: моногліцериди — 54%, дигліцериди — 2%, тригліцериди — 1%, вільний гліцерин — 1%. Кислоти етерифіковані гліцерином — C12 — лауринова кислоти.

Від курчат відбирали тканини дванадцятипалої кишки з вмістом. Матеріал зберігали для дослідження замороженим за температури  $-18 \dots -22^{\circ}\text{C}$ . Кількісний склад мікрофлори визначали приготуванням десятикратних розведень та висівів їх на відповідні поживні середовища. Для визначення кількості бактерій групи кишкової палички (БГКП) посіви проводили на середовище Ендо, стафілококів — на середовище Бейд-Паркера, ентерококів — на жовтково-ескуліновий агар, клостридій — залізовміщуючий сульфідний агар Вільсона-Блера. Посіви культивували 24 год. в термостаті за температури  $37^{\circ}\text{C}$ . Підрахунок та інтерпретацію результатів проводили за ISO 7218.

Для дослідження вмісту молекулярних маркерів методом вестерн блотингу тканини кишечника гомогенізували у трис-буфері. Білкові фракції отримували з супернатантів після центрифугування 20 000 г протягом 45 хв. Білкові зразки кишечника розділяли за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі з градієнтом щільності акриламідну 7–18% [13]. Перенесення білків з поліакриламідного гелю на нітроцелюлозу проводили за допомогою електричного поля протягом 60 хв. зі струмом 150 мА. Блокування антигену на нітроцелюлозній мембрані проводили 1%-м розчином альбуміну сироватки крові бика. Після блокування кожну мембрану окремо інкубували з розведеними 1:1500 первинними антитілами проти E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  або IFN- $\gamma$  відповідно. Після промивання мембрану інкубували з вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому. Візуалізацію поліпептидних зон проводили з використанням посиленої хемілюмінесценії і рентгенівських плівок. Результати вмісту загального білка та імуноблотингу відображали у відсотках щодо контрольної групи.

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення GraphPad Prism 8. Вибіркові параметри, представлені в роботі, мали такі позначення: M — вибіркоче середнє; SD — стандартне відхилення. Зміни показників вважали вірогідними за  $P < 0,05$ , у тому числі  $P < 0,01$  і  $P < 0,001$ .

Всі процедури з птицею проводили з дотриманням вимог, наведених у Законі України №3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого пово-

дження», узгоджених з основними принципами «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та затверджених комісією з біоетики експериментів на тваринах Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

## Результати та обговорення

Вміст E-cadherin у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів контрольної і дослідної групи на 16-у добу життя вірогідно не відрізнявся (рис. 1). Протягом експерименту модуляція експресії E-cadherin у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів контрольної групи має тенденцію до зниження, на що вказує низхідна лінія регресії, причому рівняння регресії мало вигляд:  $Y = -0.1005 \cdot X + 105.4$  ( $P=0,47$ ).

Задавання курчатам дослідної групи SCFA-M мало істотний вплив на експресію цього мембранного білка в дванадцятипалій кишці. Зокрема, з 16-ї до 22-ї доби життя у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів дослідної групи вміст E-cadherin зростав на 35,3% ( $P \leq 0,001$ ), після чого збільшення вмісту тривало до 29-добового віку (на 8,7%), однак надалі уже до 45-ї доби життя поступово знижується на 21,0% ( $P \leq 0,001$ ). Статистично більший рівень експресії E-cad у курчат дослідної групи був визначений протягом усього періоду досліджень; у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів 22-, 29-, 36- та 45-добового віку експресія вказаного білка була більшою, відповідно, на 30,4% ( $P \leq 0,001$ ), 38,8% ( $P \leq 0,001$ ), 32,6% ( $P \leq 0,001$ ) і 25,8% ( $P \leq 0,001$ ) порівняно з показниками курчат контрольної групи. Рівняння регресії вмісту E-cadherin у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів дослідної групи мало таких вигляд:  $Y = 0.5612 \cdot X + 112.8$  ( $P=0,07$ ).

Вміст fibronectin у дванадцятипалій кишці 16-добових курчат-бройлерів контрольної і дослідної групи не різнився (рис. 2). Протягом експерименту експресія fibronectin у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів контрольної групи значно зростала, що визначало висхідну лінію регресії:  $Y = 0.152 \cdot X + 99,1$ ;  $P=0,123$ .

У курчат дослідної групи з 16-ї до 22-ї доби життя у дванадцятипалій кишці вміст FN збільшується на 38,6% ( $P \leq 0,001$ ), після чого до 36-добового віку істотно не змінюється і вже до 45-ї доби життя знижується на 15,6% ( $P \leq 0,001$ ). Рівень експресії FN у дванадцятипалій кишці курчат дослідної групи 22-, 29-, 36- та 45-добового віку був більшим, відповідно, на 37,0% ( $P \leq 0,001$ ), 30,0% ( $P \leq 0,001$ ), 33,9% ( $P \leq 0,001$ ) та 17,8% ( $P \leq 0,001$ ) порівняно з показниками курчат контрольної групи. Рівняння регресії вмісту FN у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів дослідної групи становило:  $Y = 0,500 \cdot X + 113,5$  ( $P=0,104$ ).

Вміст IFN- $\alpha$  у дванадцятипалій кишці 16-добових курчат-бройлерів контрольної і дослідної групи вірогідно не різнився (рис. 3). З 16-ї до 45-ї доби життя курчат контрольної групи експресія IFN- $\alpha$  у дванадцятипалій

кишці істотно не змінюється, причому рівняння регресії мало вигляд:  $Y = 0.072 \cdot X + 101.9$ ;  $P = 0,628$ . Поряд із цим, в курчат дослідної групи вміст IFN- $\alpha$  у дванадцятипалій кишці уже до 22-ї доби життя зростав на 78% ( $P \leq 0,001$ ), після чого поступово знижувався, зокрема до 29-добового віку — на 26% ( $P \leq 0,001$ ), до 36-ї доби — на 16,4% ( $P \leq 0,05$ ) і до 45-ї доби — ще на 10,4%.

Біфазна спрямованість змін експресії IFN- $\alpha$  у дванадцятипалій кишці курчат дослідної групи була визначена для періодів 22–29 днів та 29–45 днів. Водночас отримані результати показали загальну тенденцію до зростання вмісту IFN- $\alpha$  в усіх вікових групах, де протягом 22-, 29-, 36- та 45-добового віку був вірогідно більшим, відповідно, на 71,6% ( $P \leq 0,001$ ), 47,8% ( $P \leq 0,001$ ), 29,7% ( $P \leq 0,001$ ) та 21,0% ( $P \leq 0,01$ ) порівняно з показниками курчат-бройлерів контрольної групи. Рівняння регресії вмісту цього маркера у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів дослідної групи мало вигляд:  $Y = -0,032 \cdot X + 138,7$  ( $P=0,954$ ).

Встановлено, що вміст IFN- $\gamma$  у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів контрольної і дослідної групи на 16-у добу життя вірогідно не відрізнявся і в обох групах мав тренд до зниження (рис. 4). Модуляція експресії IFN- $\gamma$  у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів контрольної групи була зменшеною на 13,9%, причому рівняння регресії мало вигляд:  $Y = -0.476 \cdot X + 100,9$  ( $P=0,002$ ).

У курчат дослідної групи з 16-ї до 22-ї доби життя у дванадцятипалій кишці вміст IFN- $\gamma$  був знижений на 46,4% ( $P \leq 0,001$ ), після чого відносно незначно зростав — на 19,5% ( $P \leq 0,01$ ); згодом знову продовжує зменшуватись до 36-добового віку — на 28,0% ( $P \leq 0,001$ ). Надалі до 45-ї доби життя вміст IFN- $\gamma$  в курчат дослідної групи падає ще на 10,2%. Рівень експресії IFN- $\gamma$  у дванадцятипалій кишці курчат дослідної групи протягом усього експерименту був вірогідно меншим від цього показника в курчат контрольної групи, зокрема у 22-, 29-, 36- та 45-добовому віці — відповідно, на 32,7% ( $P \leq 0,001$ ), 13,5% ( $P \leq 0,01$ ), 32,4% ( $P \leq 0,001$ ) і 49,9% ( $P \leq 0,001$ ). Рівняння регресії вмісту IFN- $\gamma$  у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів дослідної групи становило:  $Y = -1,89 \cdot X + 114,5$  ( $P=0,001$ ).

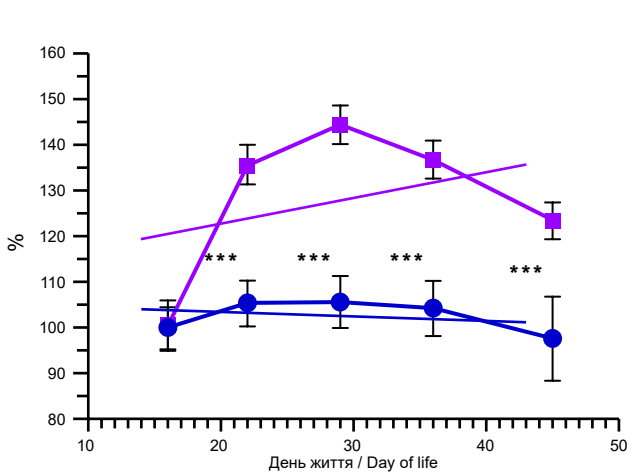
Результати дослідження дозволили встановити фундаментальну залежність вмісту молекулярних маркерів у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів протягом усього періоду досліджень. Зокрема, кореляційні зв'язки експресії вмісту E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  становили  $r = 0,98-1,00$  ( $P \leq 0,001$ ). Водночас вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 16-добових курчат-бройлерів має прямі кореляційні зв'язки з вмістом *Escherichia coli* та *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,67-0,77$ , і обернені зв'язки з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,66 \dots -0,75$ . До того ж вміст *Enterococcus spp.* обернено пов'язаний з вмістом *E. coli* та з *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,22 \dots -0,13$ , а вміст *E. coli* прямо пов'язаний із вмістом *Staphylococcus spp.* у дванадцятипалій кишці 16-добових курчат —  $r = 0,82$  (рис. 5).

Результати аналізу кореляційних співвідношень між змінами вмісту молекулярних маркерів та складу мікробіому дванадцятипалої кишки 22-добових курчат-бройлерів дослідних груп вказують на існування значної залежності вмісту усіх досліджених маркерів від прогресування *E. coli* та *Staphylococcus spp.* Вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 22-добових курчат-бройлерів контрольної групи має прямі кореляційні зв'язки з вмістом *E. coli* —  $r = 0,79-0,87$ , слабкі прямі зв'язки з *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,10-0,42$  і обернені зв'язки з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,27...0,41$ .

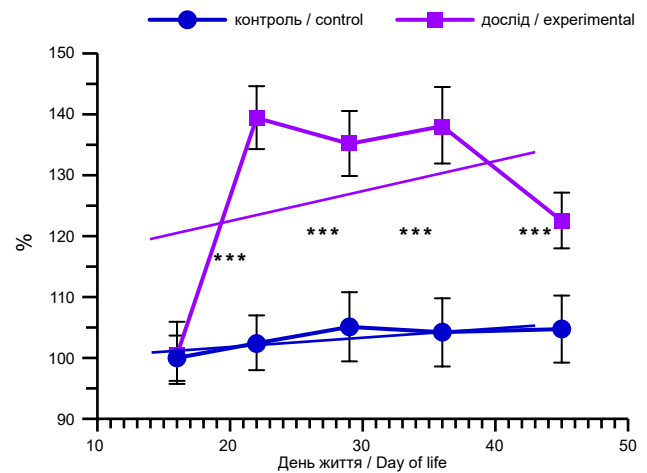
З іншого боку, в курчат контрольної групи вміст *E. coli* в дванадцятипалій кишці був обернено пов'язаний із вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,09$ , та прямо пов'язаний з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,42$ . На відміну від цього, в курчат дослідної групи такі залежності проявлені більшою мірою, зокрема

вміст *E. coli* у дванадцятипалій кишці обернено пов'язаний з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,16$ , та прямо пов'язаний з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,79$ . Крім цього, вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 22-добових курчат-бройлерів дослідної групи має слабкі прямі кореляційні зв'язки з вмістом *Escherichia coli* —  $r = 0,36-0,56$ , потужні прямі зв'язки зі *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,81-0,91$ , однак зв'язки з вмістом *Enterococcus spp.* незначні.

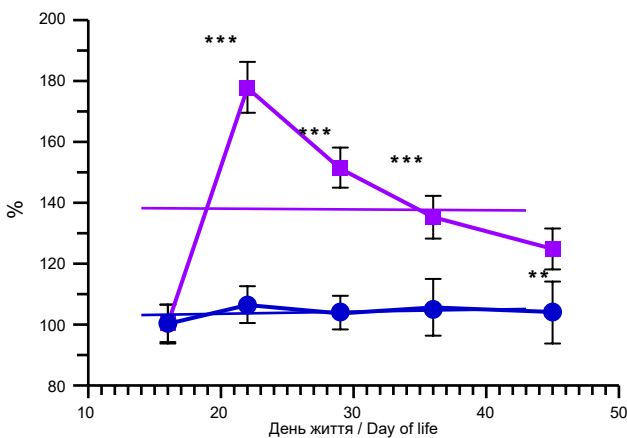
Результати аналізу кореляційних зв'язків вмісту молекулярних маркерів та мікробіому дванадцятипалої кишки 29-добових курчат-бройлерів контрольної та дослідної групи: вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 29-добових курчат-бройлерів контрольної групи має прямі кореляційні зв'язки з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,36-0,62$  і *E. coli* —



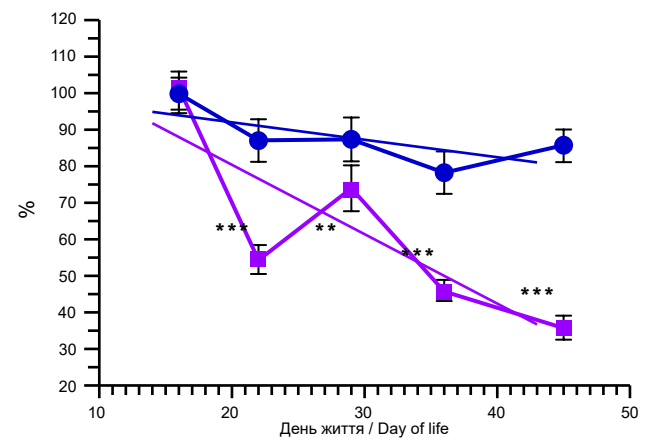
**Рис. 1.** Модуляція вмісту E-cadherin у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів за дії SCFA-M ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )  
**Fig. 1.** Modulation of E-cadherin content in duodenum of broiler chicken under SCFA-M action ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )



**Рис. 2.** Модуляція вмісту FN у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів за дії SCFA-M ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )  
**Fig. 2.** Modulation of FN content in duodenum of broiler chicken under SCFA-M action ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )

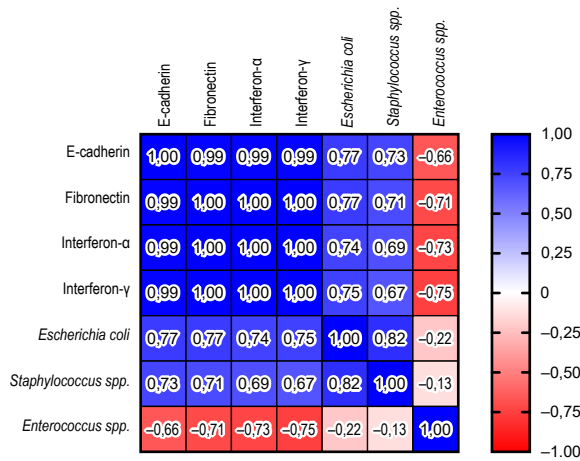


**Рис. 3.** Вміст IFN- $\alpha$  у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів за дії SCFA-M ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )  
**Fig. 3.** IFN- $\alpha$  content in duodenum of broiler chicken under SCFA-M action ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )



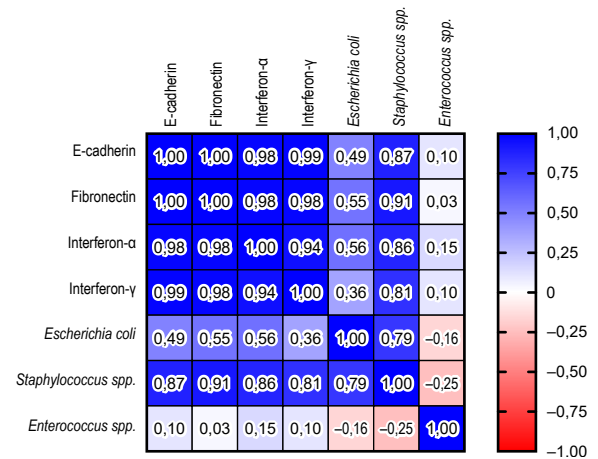
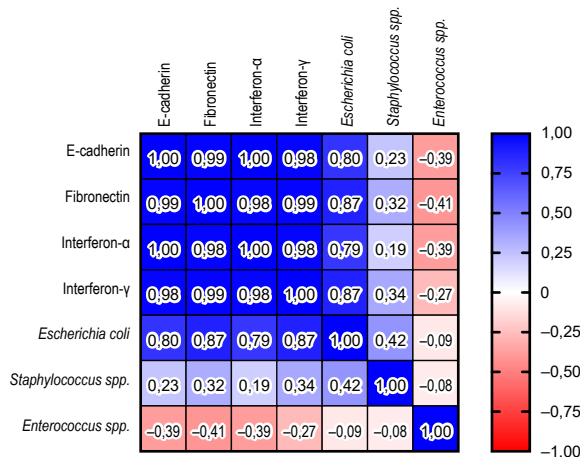
**Рис. 4.** Вміст IFN- $\gamma$  у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів за дії SCFA-M ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )  
**Fig. 4.** IFN- $\gamma$  content in duodenum of broiler chicken under SCFA-M action ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ )



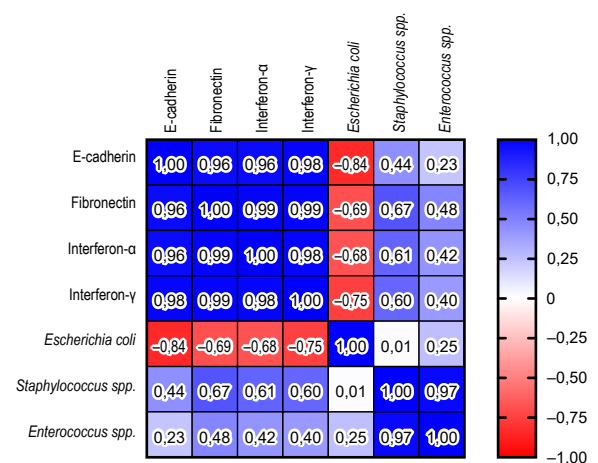
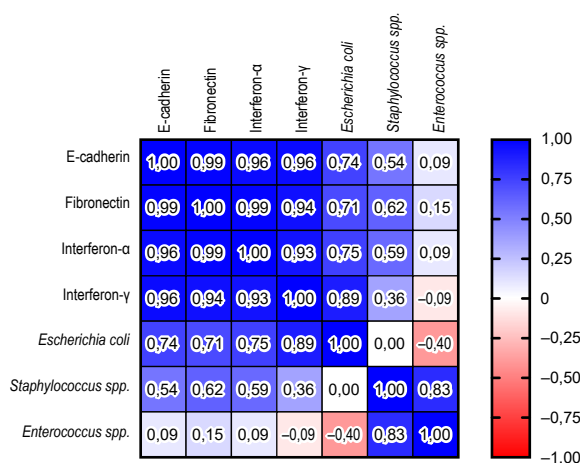


**Рис. 5.** Кореляційна матриця модуляції вмісту молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN-α та IFN-γ) та мікробіому у дванадцятипалій кишці 16-добових курчат-бройлерів (r, n=5)  
**Fig. 5.** Correlation matrix of the modulation of the molecular markers (E-cadherin, fibronectin, IFN-α and IFN-γ) content and the microbiome in the duodenum of 16-day-old broiler chickens (r, n=5)

$r = 0,71-0,89$ , тоді як з вмістом *Enterococcus spp.* кореляція відсутня. Водночас встановлено, що в курчат контрольної групи у цей час вміст *E. coli* у дванадцятипалій кишці обернено пов'язаний з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,40$ , а вміст *Staphylococcus spp.* пов'язаний з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = 0,83$ . В курчат дослідної групи вміст *E. coli* істотно не залежний від вмісту *Enterococcus spp.* та *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,01-0,25$ , однак вміст *Enterococcus spp.* у дванадцятипалій кишці сильно пов'язаний з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,97$ . Крім цього, вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN-α та IFN-γ) у дванадцятипалій кишці 29-добових курчат-бройлерів дослідної групи має обернені кореляційні зв'язки з вмістом *E. coli* —  $r = -0,84 \dots -0,68$  та прямі зв'язки зі *Staphylococcus spp.* і *Enterococcus spp.* —  $r = 0,23-0,91$ , однак зв'язки з вмістом незначні.



**Рис. 6.** Кореляційна матриця модуляції молекулярних маркерів (E-Cad, FN, IFN-α і -γ) та мікробіому дванадцятипалої кишки 22-добових курчат-бройлерів контрольної (а) та дослідної (б) груп (r, n=5)  
**Fig. 6.** Correlation matrix of the modulation of the molecular markers (E-Cad, FN, IFN-α and -γ) content and the microbiome in the duodenum of 22-day-old broiler chickens (r, n=5)



**Рис. 7.** Кореляційна матриця модуляції молекулярних маркерів (E-Cad, FN, IFN-α і -γ) та мікробіому дванадцятипалої кишки 29-добових курчат-бройлерів контрольної (а) та дослідної (б) груп (r, n=5)  
**Fig. 7.** Correlation matrix of the modulation of the molecular markers (E-Cad, FN, IFN-α and -γ) content and the microbiome in the duodenum of 29-day-old broiler chickens (r, n=5)

Результати аналізу кореляційних зв'язків вмісту молекулярних маркерів та мікробіому дванадцятипалої кишки 36-добових курчат-бройлерів контрольної і дослідної груп істотно відрізняються результатів 29-добових курчат (рис. 8). Зокрема, вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 36-добових курчат-бройлерів контрольної групи має обернені кореляційні зв'язки з вмістом *E. coli* —  $r = -0,80 \dots -0,67$ , *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,38 \dots 0,23$  і слабкі обернені зв'язки з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,16 \dots -0,07$ .

Аналіз результатів показав, що в курчат контрольної групи вміст *E. coli* у дванадцятипалій кишці обернено пов'язаний з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,33$ , та прямо пов'язаний із вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,73$ . Однак у курчат дослідної групи вміст *E. coli* в дванадцятипалій кишці більшою мірою обернено пов'язаний з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,56$ ,

та прямо пов'язаний з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,61$ . Крім цього, вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 36-добових курчат-бройлерів дослідної групи має сильні обернені кореляційні зв'язки з вмістом *E. coli* —  $r = -0,92 \dots -0,80$ , та слабкі з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,36 \dots -0,22$ , однак зв'язки з вмістом *Enterococcus spp.* прями та слабкі.

Результати аналізу кореляційних зв'язків показали високий ступінь впливу складу мікробіому на модуляцію молекулярних маркерів дванадцятипалої кишки 45-добових курчат-бройлерів дослідної групи. Вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 45-добових курчат-бройлерів контрольної групи має прями слабкі кореляційні зв'язки з вмістом *E. coli* та *Enterococcus spp.* —  $r = -0,30 \dots 0,16$ , однак зв'язки з *Staphylococcus spp.* обернені і значно сильніші —  $r = -0,83 \dots -0,51$ .

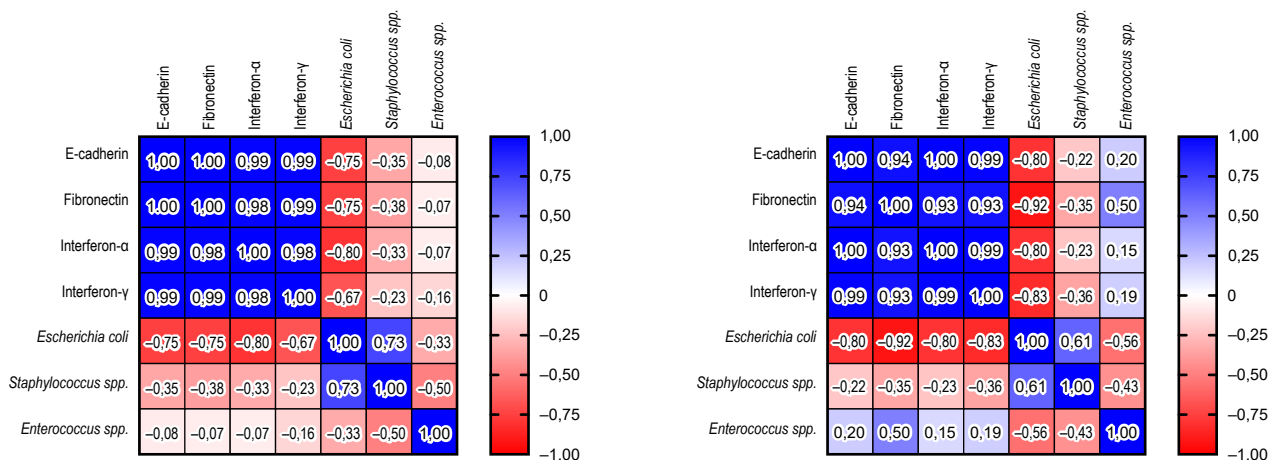


Рис. 8. Кореляційна матриця модуляції молекулярних маркерів (E-Cad, FN та IFN- $\alpha$  і  $\gamma$ ) та мікробіому дванадцятипалої кишки 36-добових курчат-бройлерів контрольної (а) та дослідної (б) груп ( $r, n=5$ )

Fig. 8. Correlation matrix of the modulation of the molecular markers (E-Cad, FN, IFN- $\alpha$  and  $\gamma$ ) content and the microbiome in the duodenum of 36-day-old broiler chickens ( $r, n=5$ )

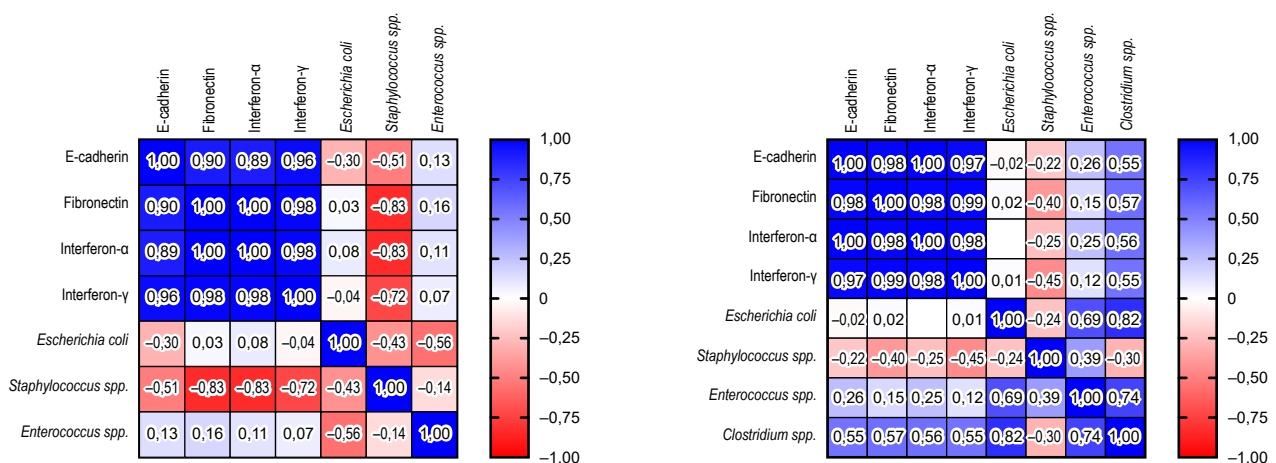


Рис. 9. Кореляційна матриця модуляції молекулярних маркерів (E-Cad, FN та IFN- $\alpha$  і  $\gamma$ ) та мікробіому дванадцятипалої кишки 45-добових курчат-бройлерів контрольної (а) та дослідної (б) груп ( $r, n=5$ )

Fig. 9. Correlation matrix of the modulation of the molecular markers (E-Cad, FN, IFN- $\alpha$  and  $\gamma$ ) content and the microbiome in the duodenum of 45-day-old broiler chickens ( $r, n=5$ )

В курчат контрольної групи вміст *E. coli* у дванадцятипалій кишці обернено пов'язаний з вмістом *Enterococcus spp.* —  $r = -0,56$ , та із вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,43$ . На противагу, в курчат дослідної групи ці залежності відмінні, зокрема, вміст *E. coli* в дванадцятипалій кишці прямо пов'язаний з вмістом та *Enterococcus spp.* —  $r = 0,69$ , та обернено пов'язаний з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,24$ .

Також встановлено, що вміст *Clostridium spp.* у дванадцятипалій кишці курчат дослідної групи прямо пов'язаний з вмістом *E. coli* —  $r = 0,82$ , з *Enterococcus spp.* —  $r = 0,74$ , та обернено пов'язаний із вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,30$ . Вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцятипалій кишці 45-добових курчат-бройлерів дослідної групи має слабкі кореляційні зв'язки з вмістом *Escherichia*, *Staphylococcus spp.* та *Enterococcus spp.* — від  $r = -0,45$  до  $r = 0,26$ , однак зв'язки з вмістом *Clostridium spp.* у дванадцятипалій кишці значно сильніші —  $r = -0,55 \dots 0,57$ .

Епітеліальні клітини, зв'язані між собою різними міжклітинними білками, є першою лінією захисту від бактерій та їхніх токсинів. Клаудіни, оклюдіни та інші білки, розташовані на апікальній поверхні базолатеральної мембрани, утворюючи парацелюлярні шляхи, регулюють проникність через епітеліальний моношар та відповідають за полярність клітин [19]. Цілісність структури суттєво залежить від рівнів експресії білків міжклітинних з'єднань [23]. Ми встановили фундаментальні взаємозв'язки модуляції вмісту молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) як у дванадцятипалій, так і сліпій кишці курчат-бройлерів протягом експерименту —  $r = 0,98-1,00$  ( $P \leq 0,001$ ).

У проведених дослідженнях уперше встановлено динаміку модуляції експресії молекулярних маркерів в сліпій та дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів. Зокрема, модуляція експресії E-cadherin у сліпій кишці курчат-бройлерів контрольної групи з 16-ї до 22-ї доби збільшується на 5,7%, після чого до 45-ї доби життя курчат поступово знижується на 7,2%. Водночас експресія E-cadherin в дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів є менш динамічною і протягом експерименту показує тенденцію до зниження.

Компонент екстра-целюлярного матриксу fibronectin відіграє важливу роль у підтриманні здоров'я кишки бройлерів, забезпечуючи клітинну адгезію, захист від патогенів та сприяючи процесам загоєння і ремоделювання тканин [8, 9]. Оптимальні умови утримання та збалансоване харчування є ключовими факторами, які сприяють підтриманню належного рівня fibronectin та забезпечують здоров'я і високу продуктивність птахів [5]. Експресія fibronectin у дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів контрольної групи з 16- до 36-добового віку збільшується на 5,2%, однак уже до 45-добового віку зменшується на 9,6%.

Інтерферони — це сімейство цитокінів, які проявляють свою біологічну активність, зв'язуючи специфічні рецептори клітинної мембрани, запускають

сигнальний шлях, кульмінацією якого є індукція транскрипції інтерферон-стимульованого гена (ISG) [17]. Таким чином, через ISG продукція IFN стимулює різноманітні клітинні та фізіологічні результати, зокрема протівірусну, апоптотичну, антипроліферативну, протипухлинну та імуномодулюючу дію [18]. Результати представленого дослідження показали, що продукція IFN- $\alpha$  була стимульована споживанням кормової добавки SCFA-M та, відповідно, посиленням реакцій вродженого імунітету у дванадцятипалій кишці курчат.

Показано, що деякі органічні кислоти можуть впливати на рівень експресії білків міжклітинної адгезії [10]. Зокрема, масляна кислота, яка є однією з основних жирних кислот, може сприяти зниженню експресії E-cadherin в окремих типах епітеліальних клітин. Зниження вмісту E-cadherin може ініціювати критично важливі наслідки послаблення клітинної адгезії та інших процесів, які відбуваються в епітеліальних тканинах кишечника [16, 2, 6]. Споживання курчатами дослідної групи SCFA-M мало істотний вплив на експресію E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  в дванадцятипалій кишці. Зокрема, з 16-ї до 22-ї доби життя вміст E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  збільшується, відповідно, на 35,3% ( $P \leq 0,001$ ), 38,6% ( $P \leq 0,001$ ) та 78% ( $P \leq 0,001$ ). Вміст IFN- $\gamma$ , навпаки, був знижений на 46,4% ( $P \leq 0,001$ ). З 36-ї до 45-ї доби життя знижується рівень експресії E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  в дванадцятипалій кишці курчат — на 21,0% ( $P \leq 0,001$ ), 15,6% ( $P \leq 0,001$ ), 10,4% та 10,2% нижчий відповідно порівняно з контролем. Попри таку тенденцію до зниження, вищий рівень експресії E-cadherin виявлено в курчат дослідної групи протягом усього періоду досліджень на 25,8–30,4% ( $P \leq 0,001$ ), FN — на 17,8–37,0% ( $P \leq 0,001$ ), IFN- $\alpha$  — на 21,0–71,6% ( $P \leq 0,001$ ), та менший вміст IFN- $\gamma$  — на 13,5%–49,9% ( $P \leq 0,01-0,001$ ) порівняно з показниками контрольної групи. Виявлені кореляційні співвідношення між складом мікробіому та модуляцією вмісту молекулярних маркерів бар'єрної функції тонкого кишечника курчат бройлерів представлені вперше.

Окремі результати недавніх досліджень показали, що стан мікробіоти впливає на модуляцію білків міжклітинної адгезії, зокрема зміни співвідношення головних таксонів мікробіоти індують модуляцію вмісту адгезивних білків, серед яких E-cadherin, occludin та claudin [14, 7]. Сталий склад мікробіоти сприяє збереженню балансу між цими білками і забезпечує оптимальне функціонування бар'єрної функції кишечника [21]. Представлені нами результати співвідносяться з літературними даними про вплив мікробіоти на молекулярні механізми, які забезпечують сталу бар'єрну функцію кишечника продуктивних тварин [13]. Отримані в нашому дослідженні результати дозволили встановити значний рівень кореляції та взаємозалежності динамічних змін вмісту молекулярних маркерів і стану мікробіому дванадцятипалої та сліпої кишки курчат. Вміст молекулярних маркерів (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ ) у дванадцяти-

палій кишці взаємопов'язаний з мікробіомом цих кишок. У 16-добових курчат-бройлерів вміст вказаних білків пов'язаний з вмістом у дванадцятипалій кишці *E. coli* та *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,67-0,77$ , та *Enterococcus spp.* —  $r = -0,66...-0,75$ ; у 22-добових курчат з вмістом *E. coli* —  $r = 0,79-0,87$ ; у 29-добових курчат-бройлерів з вмістом *E. coli* —  $r = -0,84...-0,68$ , та *Staphylococcus spp.* і *Enterococcus spp.* —  $r = 0,23-0,91$ ; у 45-добових курчат-бройлерів з вмістом *Staphylococcus spp.* —  $r = -0,83...-0,51$ . За задавання SCFA-М курчатам-бройлерам згадані закономірності дещо змінюються, зокрема зазначимо про сильні прямі зв'язки зі *Staphylococcus spp.* —  $r = 0,81-0,91$  з вмістом E-Cad, FN та IFN- $\alpha$  і IFN- $\gamma$  дванадцятипалій кишці 22-добових курчат-бройлерів. У 36-добових курчат-бройлерів дослідної групи простежили сильні обернені кореляційні зв'язки вказаних білків з вмістом *Escherichia coli* —  $r = -0,92...-0,80$ .

Споживання кормової добавки SCFA-М сприяло активації експресії E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$  та зниженню експресії IFN- $\gamma$  в дванадцятипалій кишці курчат-бройлерів. Водночас застосування SCFA-М індувало зниження вмісту *Escherichia coli* та *Staphylococcus spp.*, що свідчить про пригнічення проліферації патогенних та умовно патогенних таксонів у тонкому кишечнику курчат бройлерів. Визначені коефіцієнти кореляції між вмістом молекулярних маркерів бар'єрної функції кишечника та складом мікробіому вказують на взаємозв'язок між вмістом метаболітів, які продукуються ентеропатогенами та механізмами регуляції інтестинального бар'єру. Аналіз кореляційних матриць показав наявність як прямих, так і обернених залежностей впливу стану мікробіому на модуляцію молекулярних маркерів інтестинального бар'єру. Подальші дослідження молекулярних маркерів інтестинального бар'єру сприятимуть створенню ефективної і раціональної стратегії підтримки здоров'я травної системи.

## Джерела

1. Abdelli N, Solà-Oriol D, Pérez JF. Phytogetic feed additives in poultry: Achievements, Prospective and challenges. *Animals*. 2021; 11 (12): 3471. DOI: 10.3390/ani11123471.
2. Alaaeldin R, Abuo-Rahma GEDA, Zhao QL, Fathy M. Modulation of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition E-cadherin/TGF- $\beta$ /Snail/TWIST pathways by a new ciprofloxacin chalcone in breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2021; 41 (5): 2383–2395. DOI: 10.21873/anticancerres.15013.
3. Courjean O, Chevreux G, Perret E, Morel A, Sanglier S, Potier N, Engel J, van Dorsselaer A, Feracci H. Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry*. 2008; 47 (8): 2339–2349. DOI: 10.1021/bi701340d.
4. Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85 (6): 1629–1642. DOI: 10.1007/s00253-009-2355-3.
5. El-Sahn AA, Manaa EA, El-Barbary AM, Khalifah AM, Fayez S, Abdel-Daim ASA, Albadrani GM, Abdel-Daim MM, Abdel-Latif MA. Lemongrass extract enhances productive performance, blood

6. biomarkers, immunity, and gut health of broilers. *Heliyon*. 2024; 10 (18): e37783. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e37783.
7. Fomicheva M, Tross EM, Macara IG. Polarity proteins in oncogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2020; 62: 26–30. DOI: 10.1016/j.ccb.2019.07.016.
8. Ghosh S, Whitley CS, Haribabu B, Jala VR. Regulation of intestinal barrier function by microbial metabolites. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021; 11 (5): 1463–1482. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2021.02.007.
9. Gimeno-LLuch I, Benito-Jardón M, Guerrero-Barberà G, Burday N, Costell M. The role of the fibronectin synergy site for skin wound healing. *Cells*. 2022; 11 (13): 2100. DOI: 10.3390/cells11132100.
10. Kanta J, Zavadakova A. Role of fibronectin in chronic venous diseases: A review. *Vascular Med*. 2020; 25 (6): 588–597. DOI: 10.1177/1358863X20947789.
11. Liu Q, Yu Z, Tian F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microb Cell Fact*. 2020; 19: 23. DOI: 10.1186/s12934-020-1289-4.
12. Liu T, Tang J, Feng F. Medium-chain  $\alpha$ -monoglycerides improves productive performance and egg quality in aged hens associated with gut microbiota modulation. *Poult Sci*. 2020; 99 (12): 7122–7132. DOI: 10.1016/j.psj.2020.07.049.
13. Mantzios T, Tsiouris V, Kiskinis K, Economou V, Petridou E, Tsitsos A, Patsias A, Apostolou I, Papadopoulos GA, Giannenas I, Fortomaris P. *In vitro* investigation of the antibacterial activity of nine commercial water disinfectants, acidifiers, and glyceride blends against the most important poultry zoonotic bacteria. *Pathogens*. 2023; 12 (3): 381. DOI: 10.3390/pathogens12030381.
14. Masiuk DM, Kokariyev AV, Buzoianu SG, Firth AM, Nedzvetsky VS. An isotonic protein solution favorably modulated the porcine intestinal immune response and cellular adhesion markers and reduced PEDV shedding *in vivo*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2024; 271: 110753. DOI: 10.1016/j.vetimm.2024.110753.
15. Masiuk DM, Nedzvetsky VS. Muramyl peptide blend ameliorates intestinal inflammation and barrier integrity in cell culture model. *Gastroenterologia*. 2024; 58 (3): 179–185. DOI: 10.22141/2308-2097.58.3.2024.621.
16. Nguyen TD, Prykhodko O, Hällenius FF, Nyman M. Monobutyrin reduces liver cholesterol and improves intestinal barrier function in rats fed high-fat diets. *Nutrients*. 2019; 11 (2): 308. DOI: 10.3390/nu11020308.
17. Osman IO, Garrec C, de Souza GAP, Zarubica A, Belhaoui DB, Baudoin JP, Lepidi H, Mege JL, Malissen B, La Scola B, Devaux C. Control of CDH1/E-cadherin gene expression and release of a soluble form of E-cadherin in SARS-CoV-2 infected Caco-2 intestinal cells: Physiopathological consequences for the intestinal forms of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 798767. DOI: 10.3389/fcimb.2022.798767.
18. Park JW, Ndimukaga M, So J, Kim S, Truong AD, Tran HTT, Dang HV, Song KD. Molecular analysis of chicken interferon-alpha inducible protein 6 gene and transcriptional regulation. *J Anim Sci Technol*. 2023; 65 (1): 183–196. DOI: 10.5187/jast.2022.e101.
19. Parker N, Porter ACG. Identification of a novel gene family that includes the interferon-inducible human genes 6–16 and ISG12. *BMC Genom*. 2004; 5: 8. DOI: 10.1186/1471-2164-5-8.
20. Pérez-Reytor D, Puebla C, Karahanian E, García K. Use of short-chain fatty acids for the recovery of the intestinal epithelial barrier affected by bacterial toxins. *Front Physiol*. 2021; 12: 650313. DOI: 10.3389/fphys.2021.650313.
21. Pinho SS, Seruca R, Gärtner F, Yamaguchi Y, Gu J, Taniguchi N, Reis CA. Modulation of E-cadherin function and dysfunction by N-glycosylation. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68 (6): 1011–1020. DOI: 10.1007/s00018-010-0595-0.
22. Qiu P, Ishimoto T, Fu L, Zhang J, Zhang Z, Liu Y. The gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 733992. DOI: 10.3389/fcimb.2022.733992.



22. Salah AS, Ahmed-Farid OA, El-Tarabany MS. Carcass yields, muscle amino acid and fatty acid profiles, and antioxidant indices of broilers supplemented with synbiotic and/or organic acids. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2019; 103 (1): 41–52. DOI: 10.1111/jpn.12994.
23. Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Digest Dis Sci.* 2012; 57: 3126–3135. DOI: 10.1007/s10620-012-2259-4.

## The modulation of intestinal barrier integrity in broiler chickens is associated with the microbiome changes

L. M. Tamchuk, D. M. Masiuk

Dnipro State Agrarian and Economic University, 25 Sergiy Yefremov str., Dnipro, 49009, Ukraine

Cell adhesion proteins play a crucial role in ensuring the barrier function of the intestinal epithelium by forming intercellular tight junctions that prevent the invasion of harmful substances, microorganisms, and toxins into the organism's internal environment. However, the comprehensive impact of SCFA-M on the modulation of these proteins and their connection with the microbiome of the duodenal intestine of broiler chickens has been overlooked by researchers, thus emphasizing the significance of these studies. The research was carried out on *Cobb 500* broiler chickens in conditions of industrial poultry farming. The experimental group chickens were administered with SCFA-M in drinking water (1% solution of C-3 C-10). The results of the experiment revealed that the administration of SCFA-M to chickens was characterized by increased expression of E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$ , and decreased expression of IFN- $\gamma$  in the duodenum of broiler. Specifically, SCFA-M administration to chickens was associated with an increase in the expression level of E-cadherin in the duodenal intestine by 25.8–30.4% ( $P \leq 0.001$ ), fibronectin by 17.8–37.0% ( $P \leq 0.001$ ), IFN- $\alpha$  by 21.0–71.6% ( $P \leq 0.001$ ), and a decrease in the expression of IFN- $\gamma$  by 13.5%–49.9% ( $P \leq 0.01$ – $0.001$ ) compared to the control group chickens. The correlations of molecular marker expression (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ) in the duodenum of broiler chickens significantly varied throughout the technological cycle not only in magnitude but also in its trend. Obtained results demonstrated that the marker content was positively correlated with *Escherichia coli* content ( $r = 0.79$ – $0.87$ ) in 22-day-old broiler chickens. Contrary, marker content was negatively correlated with *E. coli* content ( $r = -0.84$ ... $-0.68$ ), *Staphylococcus spp.* and *Enterococcus spp.* ( $r = 0.23$ – $0.91$ ) in 29-day-old chickens. Furthermore, this index was negatively correlated with *Staphylococcus spp.* content ( $r = -0.83$ ... $-0.51$ ) in 45-day-old chickens. The exposure to SCFA-M induced the changes which associated with strong direct correlations of E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  with *Staphylococcus spp.* content in the duodenum of 22-day-old broiler chickens ( $r = 0.81$ – $0.91$ ). Molecular markers content exhibited strong inverse correlation links with *E. coli* content in 36-day-old broiler chickens ( $r = -0.92$ ... $-0.80$ ). Thus, the application of SCFA-M induced the beneficial effect on the modulation of molecular marker expression (E-cadherin, fibronectin, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ) in the duodenum. The further research required to construct the optimized protocols for SCFA-M applying in poultry farming, which would replace or minimize the use of antibacterial drugs.

**Key words:** broiler chickens, SCFA, microbiome, E-cadherin, fibronectin, interferon- $\alpha$ , interferon- $\gamma$