

DOI <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2025-3.22>
УДК 636.4:612.3:591.1

Шептуха О. А.

*аспірант кафедри фізіології, біохімії тварин і лабораторної діагностики,
Дніпровський державний аграрно-економічний університет*

Дніпро, Україна

E-mail: shepto@icloud.com

ORCID: 0009-0000-5860-5385

Масюк Д. М.

*доктор ветеринарних наук, професор,
завідувач кафедри фізіології, біохімії тварин і лабораторної діагностики,
Дніпровський державний аграрно-економічний університет*

Дніпро, Україна

E-mail: dimasiuk@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2800-2580

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКИ ЕКСПРЕСІЇ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ЗІ СТАНОМ МІКОБІОМУ У ДВНАДЦЯТИПАЛІЙ КИШЦІ ПОРОСЯТ

Анотація

У роботі представлено результати комплексного дослідження, спрямованого на встановлення взаємозв'язків між експресією ключових молекулярних маркерів кишкового епітелію (E-CAD, fibronectin, IFN- α , TNF- α , GFAP, Casp-3) і станом мікробіому тонкої кишки поросят у ранньому постнатальному періоді. Актуальність дослідження зумовлена необхідністю глибшого розуміння механізмів становлення бар'єрної та імунної функції кишечника, особливо в контексті впливу біологічно активних нутрицевтичних засобів. У досліді використано 168 трипородних гібридних поросят генетики DanBred, розділених на контрольну та дослідну групи. Тваринам дослідної групи у віці із 3-ї до 8-ї доби випоювали ізотонічно-протеїнову суміш (ППС). У віці 9, 21 і 35 днів відбирали зразки тканин дванадцятипалої та порожньої кишки для оцінювання експресії маркерів методом Western blot, а також проби вмісту кишечника для бактеріального аналізу. Встановлено, що в поросят як контрольної, так і дослідної групи спостерігається сильна позитивна кореляція між маркерами клітинної адгезії, позаклітинного матриксу, прозапальної відповіді, гліальної активності й апоптозу, що свідчить про їхню координацію у формуванні функціонального стану кишкового бар'єра. У контрольної групи виражена присутність *Escherichia coli* та *Staphylococcus* spp. була пов'язана з підвищеною експресією прозапальних і апоптотичних маркерів, що вказує на потенційний патогенний тиск цих таксонів. Натомість у поросят, які отримували ізотонічно-протеїнову суміш, спостерігалися стабілізація мікробного середовища, зменшення інтенсивності прозапальних взаємодій, збереження позитивних внутрішньогрупових зв'язків між молекулярними маркерами та зниження чутливості до колонізації умовно-патогенними бактеріями. Найбільш виражений ефект ізотонічно-протеїнової суміші виявлено на 35-ту добу, коли відзначено гармонізацію сигнальної взаємодії в осі «мікробіом – епітелій – нейроімунна відповідь». Отримані дані свідчать про потенціал ізотонічно-протеїнової суміші як ефективного модулятора формування нейро-епітеліального гомеостазу та можливого засобу для підтримки кишкового здоров'я поросят у критичні періоди розвитку.

Ключові слова: поросята, кишечник, молекулярні маркери, ізотонічно-протеїнова суміш, відлучення.

Вступ. Формування функціонального стану травної системи поросят у ранньому постнатальному періоді тісно пов'язане з розвитком кишкового мікробіому й активацією молекулярних механізмів, що регулюють бар'єрну й імунну функцію кишечника [13; 14]. У цей критичний для онтогенезу етап поросята вразливі до порушень гомеостазу через інтенсивну колонізацію слизових оболонок, зміну типу годівлі та дію стресових чинників, що може спричинити дисбіоз, запальні реакції та зниження резистентності [1; 3]. Особливу увагу в сучасних дослідженнях привертає вивчення регуляторних молекул – зокрема, маркерів епітеліальної інтеграції, прозапальних цитокінів і факторів, пов'язаних із міжклітинною взаємодією, – як індикаторів адаптивної відповіді кишкового бар'єра [13; 17].

Мікробіом тонкої кишки, зокрема її проксимальних відділів – дванадцятипалої та порожньої кишки – виконує ключові функції в підтриманні імунологічного балансу [6], ферментативної активності та захисту від колонізації патогенами [8]. Зміни в його структурі можуть призводити до порушення експресії генів, пов'язаних із цілісністю епітелію (наприклад, E-cadherin), прозапальною відповіддю (IFN- γ , TNF- α) та ремоделюванням міжклітинного матриксу (наприклад, fibronectin), що, у свою чергу, відображає загальний функціональний стан кишки. Вивчення таких взаємозв'язків відкриває нові можливості для глибшого розуміння патогенезу ранніх

порушень кишечника, а також для розроблення мікробіом-орієнтованих підходів до профілактики і терапії в умовах інтенсивного свинарства.

Одним із перспективних напрямів корекції порушень бар'єрної функції кишечника у поросят є застосування біологічно активних речовин, зокрема ізотонічно-протеїнової суміші (далі – ІПС) [11]. Цей підхід базується на ідеї цілеспрямованого впливу на епітеліальні клітини кишечника й асоційовану мікробіоту з метою нормалізації їхньої структурно-функціональної взаємодії [2; 5; 9]. ІПС може сприяти відновленню морфологічної цілісності слизової оболонки, стимулювати локальні імунні механізми, підтримувати фізіологічну експресію ключових молекулярних маркерів (зокрема, E-cadherin, fibronectin, IFN- γ) і водночас позитивно впливати на склад і метаболічну активність мікробіому дванадцятипалої і порожньої кишки.

Доведено, що стабілізація мікробіоти, за участі таких засобів, опосередковано впливає на сигнальні шляхи, пов'язані з бар'єрною функцією, проліферацією ентероцитів і протизапальною регуляцією [12]. Отже, ІПС не лише забезпечує трофічну підтримку ентероцитів, а й може модулювати транскрипційну активність генів, відповідальних за збереження інтегритету кишкової стінки [7]. Використання таких інтервенцій у годівлі поросят відкриває можливості для профілактики порушень кишкового гомеостазу, зменшення ризику розвитку дисбіозу та запальних реакцій, що загалом позитивно позначається на адаптації молодняку, їхній стресостійкості, темпах росту та продуктивності [2]. Однак практичне впровадження ІПС у ветеринарну практику потребує ретельного експериментального обґрунтування її ефективності.

Мета роботи полягає в комплексному дослідженні, спрямованому на оцінювання морфофункціонального стану різних відділів тонкої кишки, визначення експресійного профілю маркерних генів і аналіз структурно-функціональних характеристик мікробіому в контексті інтегрованої відповіді організму на ранньому етапі постнатального розвитку.

Виклад основного матеріалу дослідження. У дослідженні використано 168 трипородних гібридних поросят генетики DanBred віком 2 доби, які були розподілені на контрольну та дослідну групи (по 84 тварини). Із 3-го по 8-й день життя поросята дослідної групи отримували ізотонічно-протеїнову суміш (ІПС). У віці 9, 21 і 35 діб від кожної групи відбирали по 6 поросят для евтаназії відповідно до ветеринарно-санітарних і етичних вимог. Від тварин забирали фрагменти дванадцятипалої, порожньої, клубової, сліпої, ободової та прямої кишок разом з умістом. Матеріал заморожували за температури $-18 - -22^{\circ}\text{C}$. Для аналізу експресії молекулярних маркерів у тканинах кишечника застосовували метод Western blot. Відібрані ділянки (3–5 см) гомогенізували в PBS (pH 7,4), після чого визначали концентрацію загального білка методом Бредфорда. Білки розділяли електрофорезом у градієнтному поліакриламідному гелі (7–18%) за методом Laemmli. Фарбування здійснювали 0,1%-м розчином кумасі G-250. Перенесення білків на нітроцелюлозну мембрану проводили електроблотингом за 150 мА, 60 хв. Блокування неспецифічного зв'язування виконували за допомогою бичачої сироватки. Мембрани інкубували зі специфічними кролячими первинними антитілами (1 : 1500), а потім – із вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Візуалізацію проводили у трис-HCl-буфері з діамінобензидином (DAB) та H_2O_2 . Результати експресії білків оцінювали кількісно та виражали у відсотках щодо контрольної групи.

Для комплексного аналізу мікробіоценозу кишечника поросят проводили дослідження вмісту хімусу, відібраного із шести анатомічних відділів: дванадцятипалої, порожньої, клубової, сліпої, ободової та прямої кишки. Проби відбирали одразу після діагностичного забою тварин, здійсненого відповідно до чинних ветеринарно-санітарних і етичних норм. Кількісний аналіз мікрофлори здійснювали шляхом десятикратного серійного розведення зразків відповідно до вимог ДСТУ ISO 6887-1:2003, з подальшим висівом на селективні поживні середовища. Для висіву бактерій *Escherichia coli* використовували середовище Ендо; для стафілококів – агар Бейрд – Паркера; для ентерококів – жовточно-ескуліновий агар; для анаеробних *Clostridium spp.* – сульфітний агар Вільсона – Блера. Посіви інкубували за температури $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ упродовж 20–24 годин. Кількісне оцінювання росту колоній і подальшу інтерпретацію результатів проводили згідно зі стандартом ISO 7218.

Статистичну обробку отриманих результатів (побудова кореляційної матриці) виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення “Prism 10”. Показники вважали достовірними за $P < 0,05$ (зокрема, $P < 0,01$ і $P < 0,001$).

Аналіз кореляційної матриці показав значущі взаємозв'язки між молекулярними маркерами клітинної адгезії, позаклітинного матриксу, запальної відповіді, маркером гліальної реактивності, активністю апоптозу та рівнем *E. coli*, *Staphylococcus spp.* і *Enterococcus spp.* у кишечнику поросят (рис. 1). Рівень E-CAD у дванадцятипалій кишці поросят контрольної групи мав сильний прямий зв'язок з IFN- α ($r = 1,00$; $P < 0,001$), TNF- α ($r = 0,99$; $P < 0,001$), GFAP ($r = 0,96$; $P < 0,01$) і Casp-3 ($r = 0,96$; $P < 0,01$). Це свідчить про узгоджену активацію механізмів міжклітинної адгезії, запального процесу й апоптозу [15]. Також було виявлено високу кореляцію між FN та IFN- α ($r = 0,91$; $P < 0,01$), GFAP ($r = 0,96$; $P < 0,01$), TNF- α ($r = 0,88$; $P < 0,05$) та Casp-3 ($r = 0,96$; $P < 0,01$), що вказує на можливий взаємозв'язок між позаклітинним матриксом і запальною відповіддю [14]. Серед бактеріальних таксонів найбільшу кореляцію з імунними маркерами мав рівень *E. coli*. Її рівень позитивно корелював з IFN- α , TNF- α ($r = 0,70$), Casp-3 ($r = 0,68$) та GFAP ($r = 0,51$), що вказує на активну участь цього таксона у формуванні запальної реакції та потенційного впливу на нейро-гліальні взаємодії.

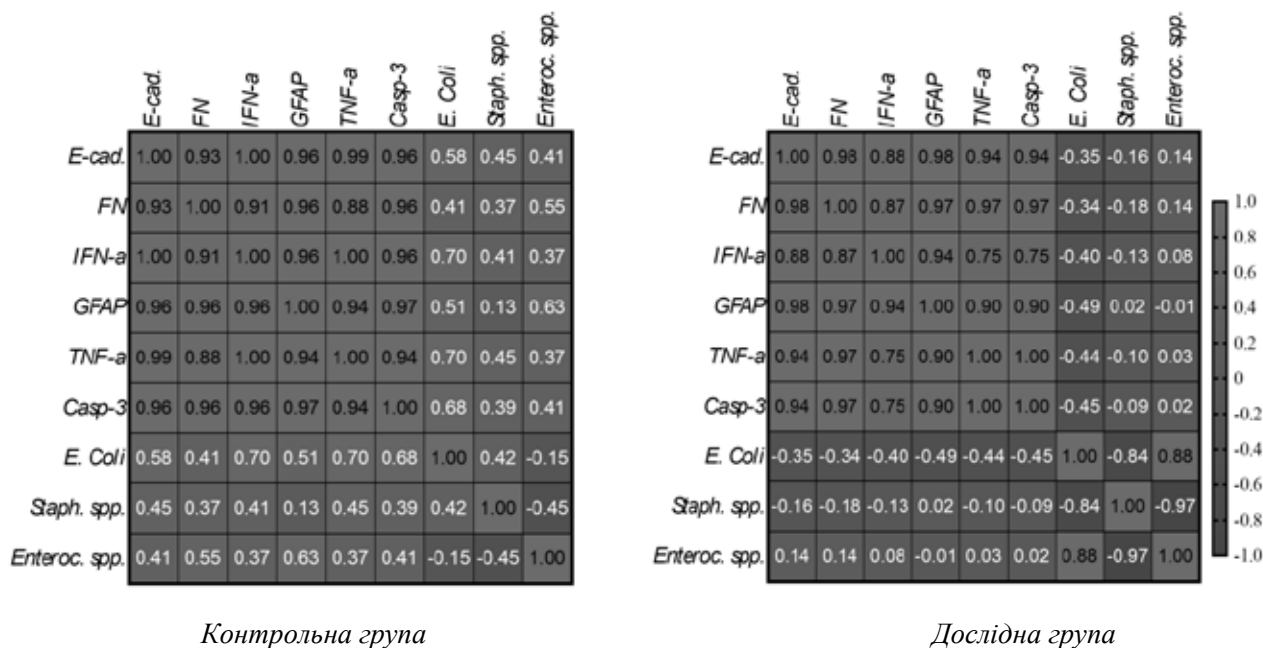


Рис. 1. Взаємозв'язки експресії молекулярних маркерів зі станом мікробіому у дванадцятипалій кишці 9-добових поросят за дії ІПС* (r; n = 6)

Примітка: * – показники достовірні за: $P < 0,05 - r = \pm 0,81-0,91$; $P < 0,01 - r = \pm 0,92-0,96$; $P < 0,001 - r = \pm 0,97-1,00$

Аналіз кореляційних зв'язків між експресією молекулярних маркерів і рівнем основних бактеріальних таксонів у дванадцятипалій кишці 9-добових поросят за дії ізотонічно-протеїнової суміші дозволив виявити низку закономірностей. Рівень E-CAD демонстрував високі позитивні кореляції з FN ($r = 0,98$; $P < 0,01$), IFN- α ($r = 0,88$; $P < 0,05$), GFAP ($r = 0,98$; $P < 0,01$), TNF- α ($r = 0,94$; $P < 0,05$) та Casp-3 ($r = 0,94$; $P < 0,05$). Між прозапальним TNF- α і Casp-3 спостерігалася пряма кореляція ($r = 1,00$; $P < 0,001$), що підтверджує їхню синхронну активацію у відповідь на вплив ІПС. Окрім того, сильні позитивні кореляції між FN, GFAP та TNF- α свідчать про їхню спільну участь у запальній та нейро-гліальній відповіді. На відміну від молекулярних маркерів, бактеріальні таксони демонстрували переважно негативні кореляції з рівнем маркерів клітинної активації. *E. coli* мала помітні обернені кореляції з E-CAD, FN, IFN- α , GFAP, TNF- α та Casp-3 ($r = -0,45-0,35$). Це свідчить про можливе пригнічення колонізації *E. coli* завдяки активації захисних механізмів кишкового епітелію та імунної системи [16]. Рівень *Staphylococcus spp.* також мав обернені кореляції з більшістю імунних маркерів, проте вони були менш вираженими.

Аналіз кореляційних зв'язків між експресією молекулярних маркерів клітинної адгезії та рівнем основних бактеріальних таксонів у дванадцятипалій кишці 21-добових поросят контрольної групи продемонстрував достовірні закономірності (рис. 2).

Рівень E-CAD мав сильний прямий зв'язок із FN ($r = 0,94$; $P < 0,01$), IFN- α ($r = 0,91$; $P < 0,05$), GFAP ($r = 0,91$; $P < 0,05$), TNF- α ($r = 0,84$; $P < 0,05$) та Casp-3 ($r = 0,97$; $P < 0,01$). Між FN і IFN- α спостерігалася сильна кореляція ($r = 0,97$; $P < 0,01$), що може вказувати на їхню спільну участь у регуляції імунної відповіді. TNF- α також мав сильні кореляційні зв'язки з IFN- α ($r = 0,97$; $P < 0,01$) та GFAP ($r = 0,84$; $P < 0,05$). На відміну від дослідної групи, *E. coli* демонструвала позитивні кореляції з E-CAD ($r = 0,84$), FN ($r = 0,71$), IFN- α ($r = 0,65$), GFAP ($r = 0,61$), TNF- α ($r = 0,42$) та Casp-3 ($r = 0,75$). Рівень *Staphylococcus spp.* мав значні обернені кореляції з E-CAD ($r = -0,56$), FN ($r = -0,41$), IFN- α ($r = -0,38$), GFAP ($r = -0,26$) та Casp-3 ($r = -0,37$). Це може вказувати на зменшення активної ролі *Staphylococcus spp.* у стимуляції імунної відповіді, а також на його пригнічення іншими бактеріями або захисними механізмами кишківника. *Enterococcus spp.* мав слабкі кореляції з більшістю молекулярних маркерів, але цікавою є його незначна позитивна кореляція з E-CAD ($r = 0,39$) та обернені кореляції з TNF- α і IFN- α ($r = -0,12-0,28$).

У поросят дослідної групи E-CAD мав високі позитивні кореляції з FN ($r = 0,91$; $P < 0,05$), IFN- α ($r = 0,94$; $P < 0,05$), GFAP ($r = 0,89$; $P < 0,05$), TNF- α ($r = 0,97$; $P < 0,01$) та Casp-3 ($r = 0,96$; $P < 0,01$). Це підтверджує його роль у підтримці міжклітинної взаємодії та регуляції запальних процесів у дванадцятипалій кишці [18]. Високі кореляційні зв'язки між TNF- α і GFAP ($r = 0,94$; $P < 0,05$), Casp-3 ($r = 0,99$; $P < 0,001$), а також між FN та GFAP ($r = 0,95$; $P < 0,05$) вказують на тісний зв'язок між процесами запалення, апоптозу та реактивності глії в кишковому середовищі. На відміну від 9-добових поросят, у контрольній групі 21-добових поросят *E. coli* мала помірно позитивну кореляцію з E-CAD ($r = 0,65$), FN ($r = 0,44$), IFN- α ($r = 0,53$), TNF- α ($r = 0,51$) та Casp-3 ($r = 0,47$), що може свідчити про посилення запальної відповіді за її колонізації. *Staphylococcus spp.* продемонстрував найвищі позитивні кореляції з молекулярними маркерами. Його рівень був позитивно пов'язаний з E-CAD ($r = 0,92$; $P < 0,05$), FN ($r = 0,94$;

$P < 0,05$), IFN- α ($r = 0,92$; $P < 0,05$), GFAP ($r = 0,97$; $P < 0,01$), TNF- α ($r = 0,97$; $P < 0,01$) та Casp-3 ($r = 0,95$; $P < 0,01$). Така висока взаємозалежність може вказувати на роль *Staphylococcus spp.* у стимуляції як запальних процесів, так і механізмів клітинної адгезії та апоптозу [4]. Рівень *Enterococcus spp.* мав слабкі кореляційні зв'язки з молекулярними маркерами, зокрема з FN ($r = 0,35$), E-CAD ($r = 0,32$) і TNF- α ($r = 0,18$), що може свідчити про його слабший вплив на запальні процеси у дванадцятипалій кишці поросят.

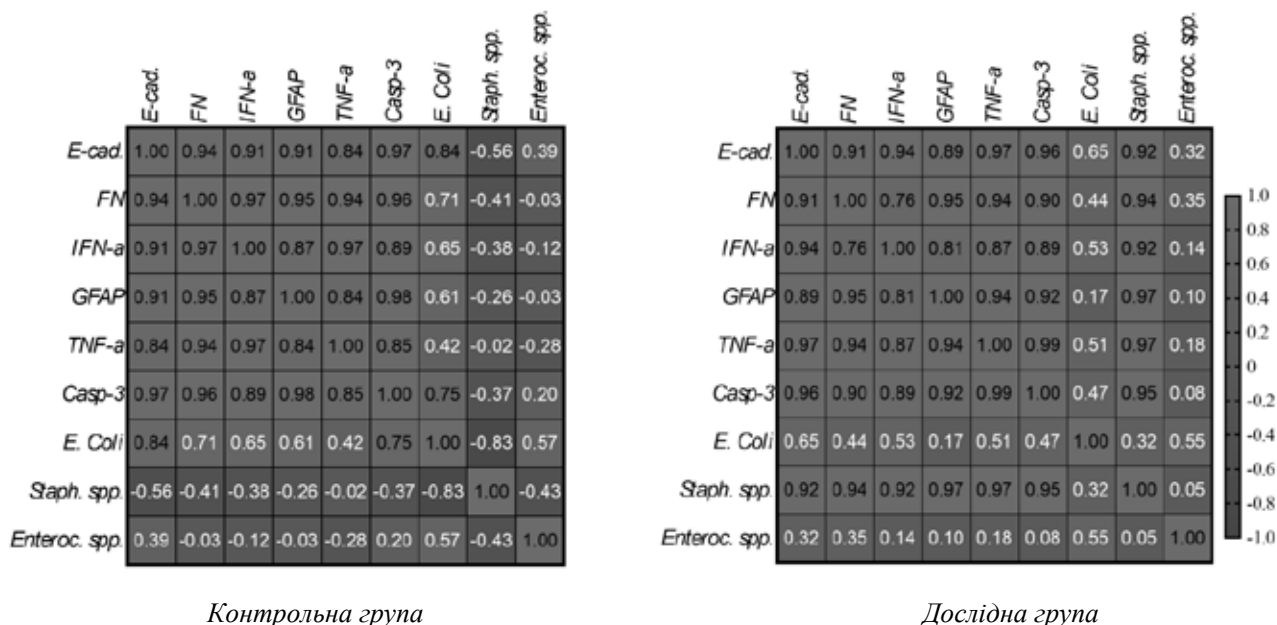


Рис. 2. Взаємозв'язки експресії молекулярних маркерів зі станом мікробіому у дванадцятипалій кишці 21-добових поросят за дії ІПС (r ; $n = 6$)

Примітка: * – показники достовірні за: $P < 0,05$ – $r = \pm 0,81$ – $0,91$; $P < 0,01$ – $r = \pm 0,92$ – $0,96$; $P < 0,001$ – $r = \pm 0,97$ – $1,00$

У 35-добових поросят відзначено ще тісніші взаємозв'язки між ключовими молекулярними маркерами порівняно з молодшими тваринами (рис. 3). E-CAD мав сильну позитивну кореляцію з FN ($r = 0,97$; $P < 0,01$), IFN- α ($r = 0,89$; $P < 0,05$), GFAP ($r = 0,97$; $P < 0,01$), TNF- α ($r = 0,94$; $P < 0,05$) і Casp-3 ($r = 0,97$; $P < 0,01$). Ці показники свідчать про посилене узгодження процесів міжклітинної адгезії, запальної відповіді та гліальної активації. FN був тісно пов'язаний з IFN- α ($r = 0,95$; $P < 0,01$), GFAP ($r = 0,98$; $P < 0,01$) та TNF- α ($r = 0,98$; $P < 0,01$), що свідчить про його ключову роль у підтримці структурної стабільності тканин кишечника та реакції на запальні сигнали. Взаємозв'язок між TNF- α , Casp-3 та GFAP залишається сильним, особливо між Casp-3 і GFAP ($r = 0,99$; $P < 0,001$). На відміну від 21-добових поросят, у 35-денному віці кореляції між бактеріальними таксонами та молекулярними маркерами стали слабшими або набули оберненого характеру. Рівень *E. coli* мав дуже слабкі або відсутні кореляції з імунними показниками. *Staphylococcus spp.* і *Enterococcus spp.* демонстрували переважно негативні кореляції з маркерами запальної відповіді ($r = -0,37$ – $0,35$) та TNF- α ($r = -0,26$). *Enterococcus spp.* також мав обернені кореляції з більшістю маркерів, зокрема з E-CAD, FN та TNF- α ($r = -0,29$ – $0,38$).

Аналіз кореляційних зв'язків між молекулярними маркерами та рівнем основних бактеріальних таксонів у дванадцятипалій кишці 35-добових поросят за дії ізотонічно-протейнової суміші показав кардинальні зміни порівняно з контрольною групою. Під впливом ІПС більшість кореляцій між молекулярними маркерами залишаються сильними. E-CAD демонструє високий прямий зв'язок із FN ($r = 0,99$; $P < 0,001$), GFAP ($r = 0,99$; $P < 0,001$), TNF- α ($r = 0,87$) та Casp-3 ($r = 0,87$), що вказує на узгоджене функціонування механізмів міжклітинної адгезії, запалення і апоптозу. Значні кореляції спостерігаються між FN і GFAP ($r = 0,97$; $P < 0,01$), а також між TNF- α та IFN- α ($r = 0,92$; $P < 0,01$), що підкреслює тісний взаємозв'язок між регуляцією позаклітинного матриксу, запальними процесами та нейро-гліальними механізмами. Casp-3, як маркер апоптозу, має максимальну кореляцію з TNF- α ($r = 1,00$; $P < 0,001$), що підтверджує активацію апоптотичних механізмів у відповідь на прозапальні сигнали [10]. На відміну від контрольної групи, бактеріальні таксони демонструють помірні кореляційні зв'язки з імунними маркерами, що може вказувати на стабілізацію мікробного середовища та зменшення впливу патогенних факторів. *E. coli* має слабкі позитивні кореляції з E-CAD ($r = 0,26$) та FN ($r = 0,29$). Водночас спостерігаються обернені кореляції з IFN- α ($r = -0,26$), TNF- α ($r = -0,26$) та Casp-3 ($r = -0,26$). *Staphylococcus spp.* демонструє помірно позитивні кореляції з E-CAD ($r = 0,54$), FN ($r = 0,59$) та GFAP ($r = 0,38$). *Enterococcus spp.* мав слабкі кореляційні зв'язки, зокрема, з E-CAD ($r = 0,20$), FN ($r = 0,23$) і GFAP ($r = 0,15$).

Результати проведеного дослідження дозволяють сформулювати концепцію, згідно з якою мікробіом тонкої кишки поросят на ранніх етапах постнатального розвитку виступає не лише пасивним компонентом травного середовища, а й активним модулятором клітинної активності, запальної відповіді та програмованої загибелі

клітин. Водночас вплив ізотонічно-протеїнової суміші (ІПС) проявляється через стабілізацію нейро-епітеліального гомеостазу, що виявляється в підтриманні сильних кореляцій між ключовими молекулярними маркерами (E-CAD, FN, TNF- α , IFN- α , GFAP, Casp-3) за умов зменшення мікробіом-опосередкованої дестабілізації [19]. Центром регуляції виступають міжклітинна адгезія (E-CAD) та позаклітинний матрикс (FN), які узгоджено активуються разом із прозапальними (TNF- α , IFN- α) і апоптотичними (Casp-3) маркерами, формують єдиний захисно-адаптаційний контур.

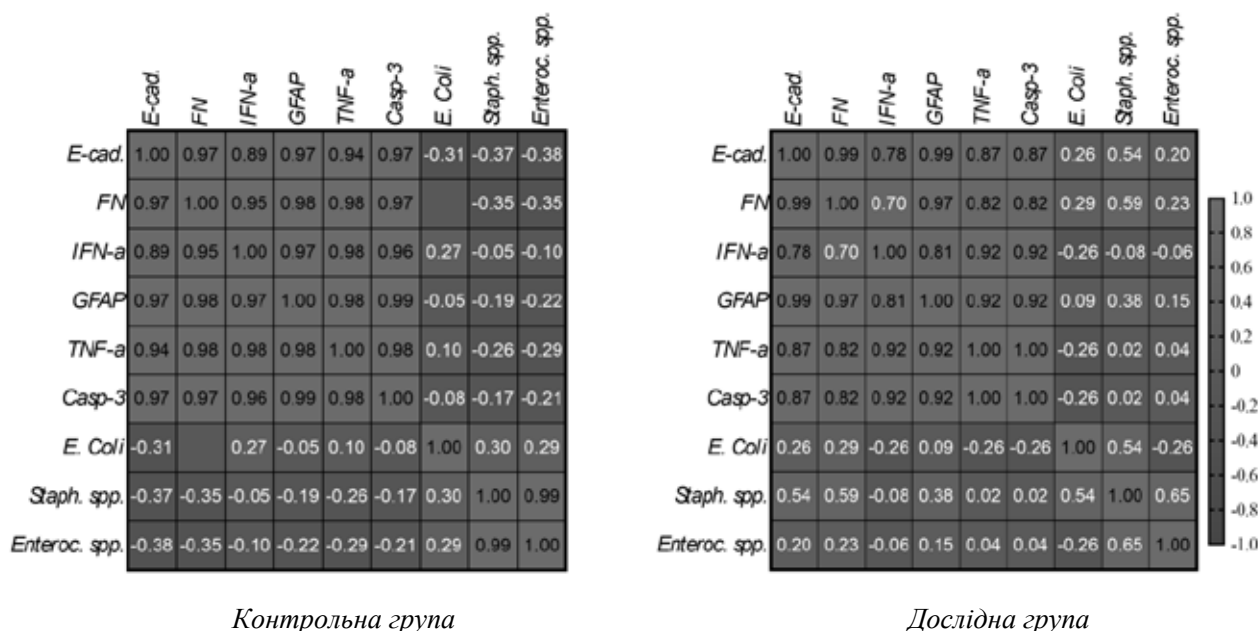


Рис. 3. Взаємозв'язки експресії молекулярних маркерів зі станом мікробіому у дванадцятипалій кишці 35-добових поросят за дії ІПС (r; n = 6)

Примітка: * – показники достовірні за: $P < 0,05 - r = \pm 0,81 - 0,91$; $P < 0,01 - r = \pm 0,92 - 0,96$; $P < 0,001 - r = \pm 0,97 - 1,00$

Роль мікробіому є неоднозначною, зокрема в контрольних умовах, *E. coli* і *Staphylococcus spp.* спричиняють активацію запалення, гліальної реактивності й апоптозу, що свідчить про їхній патогенний потенціал. Тоді як у дослідній групі під впливом ІПС спостерігається слабшання кореляцій між бактеріальними таксонами й імунними маркерами, що відображає стабілізацію мікробного середовища та зниження імунного навантаження.

Ефект ІПС можна розглядати як модуляцію сигнального каскаду «мікробіом – епітелій – нейроімунна система», що приводить до функціональної стабілізації слизової оболонки через: збереження інтегритету епітелію; контрольовану прозапальну активацію; локалізовану активацію апоптозу; зниження патогенних впливів *E. coli* й інших умовно-патогенних мікроорганізмів.

Висновки. 1. У ранньому постнатальному періоді поросят формуються тісні взаємозв'язки між молекулярними маркерами клітинної адгезії, запальної відповіді, гліальної реактивності й апоптозу, що відображає активне становлення імунної та бар'єрної функції кишкового епітелію. Встановлено, що маркери E-CAD, fibronectin, IFN- α , TNF- α , GFAP та Casp-3 демонструють високу позитивну кореляцію один з одним на різних етапах розвитку (9, 21, 35 діб). Це свідчить про координацію між міжклітинною адгезією, екстрацелюлярним ремоделюванням, запальними механізмами, гліальною активністю та програмованою загибеллю клітин. Особливо виражені ці зв'язки на 35-ту добу, що вказує на поступове формування стабільного регуляторного контуру у слизовій оболонці кишки поросят.

2. Мікробіом дванадцятипалої кишки поросят здійснює динамічний вплив на експресію імунних маркерів, причому окремі бактеріальні таксони (особливо *Escherichia coli* та *Staphylococcus spp.*) виступають активними модуляторами прозапальних реакцій. Рівень *E. coli* у 9-добових поросят контрольної групи мав позитивні кореляції з TNF- α , IFN- α та Casp-3, що свідчить про стимуляцію запальної відповіді. Проте у старшому віці характер цих зв'язків змінювався – виявлялись як зворотні, так і послаблені кореляції. Це вказує на етапність колонізації, зміну ролі бактеріальних агентів у регуляції імунної активності та можливість пригнічення патогенних ефектів у процесі дозрівання кишкової системи.

3. Застосування ізотонічно-протеїнової суміші сприяє стабілізації мікробіому та збереженню функціональної взаємодії між ключовими молекулярними маркерами кишкового епітелію, що дозволяє розглядати ІПС як ефективний нутрицевтичний інструмент для підтримки кишкового гомеостазу в поросят. У дослідній групі спостерігалось зменшення патогенних кореляцій між бактеріальними таксонами й імунними маркерами, водночас

зберігалася сильна позитивна асоціація між E-CAD, FN, TNF- α , IFN- α , GFAP та Casp-3. Це свідчить про позитивний вплив ІПС на бар'єрну, запальну й регенераторну активність слизової оболонки кишки. Отже, ІПС сприяє формуванню умов для збереження епітеліальної цілісності, зниження прозапального навантаження та модуляції взаємодії між мікробіомом і клітинними системами кишечника.

Список використаних джерел

1. Amatucci L., Luise D., Correa F., Bosi P., Trevisi P. Importance of breed, parity and sow colostrum components on litter performance and health. *Animals*. 2022. Vol. 12. № 10. P. 1230. <https://doi.org/10.3390/ani12101230>.
2. Buzoianu S.G., Firth A.M., Putrino C., Vannucci F. Early-life intake of an isotonic protein drink improves the gut microbial profile of piglets. *Animals*. 2020. Vol. 10. № 5. P. 879. <https://doi.org/10.3390/ani10050879>.
3. Campbell J.M., Crenshaw J.D., Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2013. Vol. 4. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-19>.
4. Chen H., Zhang J., He Y., Lv Z., Liang Z., Chen J., Li P., Liu J., Yang H., Tao A., Liu X. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases. *Toxins*. 2022. Vol. 14. № 7. P. 464. <https://doi.org/10.3390/toxins14070464>.
5. Clarke N.J., Tomlinson A.J., Schomburg G., Naylor S. Capillary isoelectric focusing of physiologically derived proteins with on-line desalting of isotonic salt concentrations. *Analytical Chemistry*. 1997. Vol. 69. № 14. P. 2786–2792. <https://doi.org/10.1021/ac9700546>.
6. Di Tommaso N., Gasbarrini A., Ponziani F.R. Intestinal barrier in human health and disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021. Vol. 18. № 23. P. 12836. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312836>.
7. Firth A., Martin R., Cano G. Effect of Tonisity Px administration on pre-weaning mortality and weight gain. *48th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*. 2017. P. 131–133.
8. Gieryńska M., Szulc-Dąbrowska L., Struzik J., Mielcarska M.B., Gregorczyk-Zboroch K.P. Integrity of the intestinal barrier: The involvement of epithelial cells and microbiota—a mutual relationship. *Animals*. 2022. Vol. 12. № 2. P. 145. <https://doi.org/10.3390/ani12020145>.
9. Jumaa M., Müller B.W. In vitro investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999. Vol. 9. № 2. P. 207–212. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00061-4).
10. Kuthyar S., Diaz J., Avalos-Villatoro F., Maltecca C., Tiezzi F., Dunn R.R., Reese A.T. Domestication shapes the pig gut microbiome and immune traits from the scale of lineage to population. *Journal of Evolutionary Biology*. 2023. Vol. 36. № 12. P. 1695–1711. <https://doi.org/10.1111/jeb.14126>.
11. Masiuk D.M., Kokariyev A.V., Bal R., Nedzvetsky V.S. The isotonic protein mixture suppresses Porcine Epidemic Diarrhea Virus excretion and initiates intestinal defensive response. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2022. Vol. 10. № 2. P. 23–28. <https://doi.org/10.32819/2022.10009>.
12. Masiuk D.M., Romanenko E.R., Herrman B., Nedzvetsky V.S. Fibronectin measurement as a potential molecular marker for barrier function assessment of piglet intestine. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2023. Vol. 11. № 2. <https://doi.org/10.32819/2023.11006>.
13. Modina S.C., Polito U., Rossi R., Corino C., Di Giancamillo A. Nutritional regulation of gut barrier integrity in weaning piglets. *Animals*. 2019. Vol. 9. № 12. P. 1045. <https://doi.org/10.3390/ani9121045>.
14. Mörbe U.M., Jørgensen P.B., Fenton T.M., von Burg N., Riis L.B., Spencer J., Agace W.W. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*. 2021. Vol. 14. № 4. P. 793–802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>.
15. Ogobuiro I., Gonzales J., Shumway K.R., Tuma F. Physiology, gastrointestinal. In StatPearls. *StatPearls Publishing*. 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470289/>.
16. Ramanan D., Cadwell K. Intrinsic defense mechanisms of the intestinal epithelium. *Cell Host & Microbe*. 2016. Vol. 19. № 4. P. 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>.
17. Xiao S., Chen Y., Sun Y., Gao Z., Du X., Li J., Zhao X., Liu D., Liu Z., Wang C., Sun Y. Dietary fiber ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier function damage in piglets by modulation of intestinal microbiome. *mSystems*. 2021. Vol. 6. № 2. P. e01374–20. <https://doi.org/10.1128/msystems.01374-20>.
18. Yin L., Li J., Zhang Y., Yang Q., Yang C., Yi Z., Yin Y., Wang Q., Li J., Ding N., Zhang Z., Yang H., Yin Y. Changes in progenitors and differentiated epithelial cells of neonatal piglets. *Animal Nutrition*. 2022. Vol. 8. P. 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.006>.
19. Yuan C., Li Y., Zhang E., Jin Y., Yang Q., Yuan C. The mechanism of PEDV-carrying CD3+ T cells migrate into the intestinal mucosa of neonatal piglets. *Viruses*. 2021. Vol. 13. № 3. P. 469. <https://doi.org/10.3390/v13030469>.

Sheptukha O. A.

Postgraduate Student at the Department of Animal Physiology, Biochemistry and Laboratory Diagnostics,
Dnipro State Agrarian and Economic University

Dnipro, Ukraine

E-mail: shepto@icloud.com

ORCID: 0009-0000-5860-5385

Masiuk D. M.*Doctor of Veterinary Sciences, Professor,
Head of the Department of Animal Physiology, Biochemistry and Laboratory Diagnostics,
Dnipro State Agrarian and Economic University
Dnipro, Ukraine***E-mail:** dimasiuk@gmail.com**ORCID:** 0000-0002-2800-2580

INTERRELATIONSHIPS BETWEEN THE EXPRESSION OF MOLECULAR MARKERS AND THE STATE OF THE MYCOBIOME IN THE DUODENUM OF PIGLETS

Abstract

This study presents the results of a comprehensive investigation aimed at identifying the relationships between the expression of key molecular markers of the intestinal epithelium (E-CAD, fibronectin, IFN- α , TNF- α , GFAP, Casp-3) and the state of the microbiome in the small intestine of piglets during the early postnatal period. The relevance of the research is driven by the need for a deeper understanding of the mechanisms involved in the establishment of intestinal barrier and immune functions, especially under the influence of biologically active nutraceutical compounds. The experiment involved 168 three-breed hybrid piglets of DanBred genetics divided into control and experimental groups. From days 3 to 8 of life, piglets in the experimental group were administered an isotonic protein mixture (IPM). On days 9, 21, and 35, samples of the duodenum and jejunum tissues were collected for analysis of molecular marker expression using the Western blot method, along with intestinal content samples for bacteriological evaluation. It was found that both groups demonstrated strong positive correlations among adhesion molecules, extracellular matrix proteins, pro-inflammatory markers, glial activation, and apoptosis indicators, suggesting coordinated involvement in shaping the functional state of the intestinal barrier. In the control group, a high presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. was associated with elevated expression of inflammatory and apoptotic markers, indicating potential pathogenic pressure from these taxa. In contrast, piglets that received IPM showed microbiome stabilization, reduced inflammatory signaling intensity, maintained intra-network correlations between molecular markers, and diminished susceptibility to colonization by conditionally pathogenic bacteria. The most pronounced effects of IPM were observed on day 35, when enhanced coordination in the “microbiome – epithelium – neuroimmune response” axis was recorded. These findings support the potential of IPM as an effective modulator of neuroepithelial homeostasis and a promising tool for maintaining gut health in piglets during critical developmental stages.

Key words: piglets, intestine, molecular markers, isotonic protein mixture, weaning.

References

1. Amatucci, L., Luise, D., Correa, F., Bosi, P., & Trevisi, P. (2022). Importance of breed, parity and sow colostrum components on litter performance and health. *Animals*, 12 (10), 1230. <https://doi.org/10.3390/ani12101230> [in English].
2. Buzoianu, S.G., Firth, A.M., Putrino, C., & Vannucci, F. (2020). Early-life intake of an isotonic protein drink improves the gut microbial profile of piglets. *Animals*, 10 (5), 879. <https://doi.org/10.3390/ani10050879> [in English].
3. Campbell, J.M., Crenshaw, J.D., & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4 (1), 19. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-19> [in English].
4. Chen, H., Zhang, J., He, Y., Lv, Z., Liang, Z., Chen, J., Li, P., Liu, J., Yang, H., Tao, A., & Liu, X. (2022). Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases. *Toxins*, 14 (7), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins14070464> [in English].
5. Clarke, N.J., Tomlinson, A.J., Schomburg, G., & Naylor, S. (1997). Capillary isoelectric focusing of physiologically derived proteins with on-line desalting of isotonic salt concentrations. *Analytical Chemistry*, 69 (14), 2786–2792. <https://doi.org/10.1021/ac9700546> [in English].
6. Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., & Ponziani, F.R. (2021). Intestinal barrier in human health and disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (23), 12836. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312836> [in English].
7. Firth, A., Martin, R., & Cano, G. (2017). Effect of Tonisity Px administration on pre-weaning mortality and weight gain. *48th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 131–133 [in English].
8. Gieryńska, M., Szulc-Dąbrowska, L., Struzik, J., Mielcarska, M.B., & Gregorczyk-Zboroch, K.P. (2022). Integrity of the intestinal barrier: The involvement of epithelial cells and microbiota—a mutual relationship. *Animals*, 12 (2), 145. <https://doi.org/10.3390/ani12020145> [in English].
9. Jumaa, M., & Müller, B.W. (1999). In vitro investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9 (2), 207–212. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00061-4) [in English].
10. Kuthyar, S., Diaz, J., Avalos-Villatoro, F., Maltecca, C., Tiezzi, F., Dunn, R. R., & Reese, A.T. (2023). Domestication shapes the pig gut microbiome and immune traits from the scale of lineage to population. *Journal of Evolutionary Biology*, 36 (12), 1695–1711. <https://doi.org/10.1111/jeb.14126> [in English].
11. Masiuk, D.M., Kokariev, A.V., Bal, R., & Nedzvetsky, V.S. (2022). The isotonic protein mixture suppresses Porcine Epidemic Diarrhea Virus excretion and initiates intestinal defensive response. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 10 (2), 23–28. <https://doi.org/10.32819/2022.10009> [in English].
12. Masiuk, D.M., Romanenko, E.R., Herrman, B., & Nedzvetsky, V.S. (2023). Fibronectin measurement as a potential molecular marker for barrier function assessment of piglet intestine. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 11 (2). <https://doi.org/10.32819/2023.11006>.
13. Modina, S.C., Polito, U., Rossi, R., Corino, C., & Di Giancamillo, A. (2019). Nutritional regulation of gut barrier integrity in weaning piglets. *Animals*, 9 (12), 1045. <https://doi.org/10.3390/ani9121045> [in English].

14. Mörbe, U.M., Jørgensen, P.B., Fenton, T.M., von Burg, N., Riis, L.B., Spencer, J., & Agace, W.W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, 14 (4), 793–802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00405-8> [in English].
15. Ogobuiro, I., Gonzales, J., Shumway, K.R., & Tuma, F. (2023). Physiology, gastrointestinal. In StatPearls. *Statepearls Publishing*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470289/> [in English].
16. Ramanan, D., & Cadwell, K. (2016). Intrinsic defense mechanisms of the intestinal epithelium. *Cell Host & Microbe*, 19 (4), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008> [in English].
17. Xiao, S., Chen, Y., Sun, Y., Gao, Z., Du, X., Li, J., Zhao, X., Liu, D., Liu, Z., Wang, C., & Sun, Y. (2021). Dietary fiber ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier function damage in piglets by modulation of intestinal microbiome. *mSystems*, 6 (2), e01374-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.01374-20> [in English].
18. Yin, L., Li, J., Zhang, Y., Yang, Q., Yang, C., Yi, Z., Yin, Y., Wang, Q., Li, J., Ding, N., Zhang, Z., Yang, H., & Yin, Y. (2022). Changes in progenitors and differentiated epithelial cells of neonatal piglets. *Animal Nutrition*, 8, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.006> [in English].
19. Yuan, C., Li, Y., Zhang, E., Jin, Y., Yang, Q., & Yuan, C. (2021). The mechanism of PEDV-carrying CD3+ T cells migrate into the intestinal mucosa of neonatal piglets. *Viruses*, 13 (3), 469. <https://doi.org/10.3390/v13030469> [in English].

Отримано: 25.06.2025

Рекомендовано: 04.08.2025

Опубліковано: 29.08.2025