

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ЦИНКА КАК ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В РАЦИОНАХ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ (*Gallus gallus L.*)*

Е.А. СИЗОВА¹ ✉, С.А. МИРОШНИКОВ², К.С. НЕЧИТАЙЛО¹

Значимая проблема современного птицеводства — недостаточно высокая сохранность цыплят бройлеров, обусловленная различными причинами, в том числе иммуносупрессией. Для повышения адаптационной способности и иммунореактивности с успехом применяют различные биологически активные вещества и микроэлементы. Несомненный интерес представляет использование цинка (Zn), который обладает иммуотропными свойствами, стимулирует активность иммунной и антиоксидантной систем, повышает продуктивность и сохранность животных, в составе кормовых добавок. В настоящей работе впервые показано влияние цинка из разных источников на естественную резистентность и морфофункциональную реорганизацию иммунокомпетентных органов у цыплят-бройлеров (*Gallus gallus L.*) кросса Смена 7, а также установлено преимущество использования органической и ультрадисперсной форм цинка при кормлении цыплят по сравнению с неорганической формой. Нашей целью была сравнительная оценка эффективности применения различных форм цинка в рационе цыплят-бройлеров кросса Смена 7 как модуляторов иммунной системы на основании данных биохимических исследований и характеристики микроструктуры иммунокомпетентных органов. Исследования выполняли на цыплятах-бройлерах кросса Смена 7 (три группы по 24 гол. в каждой) в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН (г. Оренбург, 2020 год). Источниками микроэлементов служили аспарагинат Zn (органическая форма, ОФ; ООО «В-Мин+», г. Сергиев Посад, Россия), минеральные соли $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (неорганическая форма, НФ; «Ленреактив», г. Санкт-Петербург, Россия) и порошок ультрадисперсных частиц Zn (УДФ Zn; ООО «Передовые порошковые технологии», г. Томск, Россия). Цыплята контрольной группы на протяжении всего опыта получали основной рацион, в котором Zn нормализовали введением сульфата $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. В опытных группах в период с 14-х по 42-е сут сульфат Zn заменяли на УДФ Zn в дозе 49 мг/кг корма (I группа) или на аспарагинат Zn в той же дозировке (II группа). Убой птицы и отбор образцов проводили в возрасте 3, 4, 5 и 6 нед. Биохимические исследования сыворотки крови осуществляли на автоматическом анализаторе CS-T240 («DIRUI Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих наборов для ветеринарных исследований DiaVetTest (АО «Диакон-ДС», Россия). Морфологический состав определяли с помощью автоматического гематологического анализатора URIT-2900 Vet Plus («URIT Medical Electronic Co., Ltd», Китай). Оценивали показатели естественной резистентности — бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), активность лизоцима (АЛ), активность β -лизинов (А β -Л), а также иммунологические показатели — показатель фагоцитов (ПФ) и фагоцитарный индекс (ФИ). Морфологические характеристики клоакальной бурсы (КБ), тимуса и селезенки определяли на гистологических срезах толщиной 5-6 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Общие структурные изменения оценивали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, на светооптическом микроскопе с программным обеспечением MT 5300L («Meiji Techno Co., Ltd», Япония). На срезах КБ определяли площадь фолликула и мозговой зоны, ширину корковой зоны; в селезенке — площадь красной и белой пульпы, плотность клеток красной и белой пульпы; в тимусе — площадь коркового и мозгового вещества, их соотношение (корковый индекс), плотность клеток красной и белой пульпы. Площадь структур определяли на 125000 мкм², плотность — на 1 мм². В 3-недельном возрасте во II группе у цыплят было отмечено повышение содержания лейкоцитов на 37,5 % ($p \leq 0,05$) в сравнении с контролем. К 4-недельному возрасту показатель повысился и при введении УДФ Zn на 40,7 % ($p \leq 0,05$). Повышение происходило за счет лимфоцитов и моноцитов. К концу эксперимента в опытных группах содержание лейкоцитов было ниже контроля. Все показатели белых клеток крови укладывались в нормативные значения. Введение УДФ Zn способствовало повышению БАСК в диапазоне от 5,8 до 16,7 % и АЛ на 8,2 % на более поздних этапах эксперимента по сравнению с контролем. Тенденция к увеличению активности А β -Л была зарегистрирована в 5-недельном возрасте с последующим снижением к концу эксперимента. Применение ОФ Zn приводило к статистически значимому ($p \leq 0,01$) повышению активности БАСК (на 13,4 %) в 3-недельном возрасте и АЛ в конце эксперимента (на 8,8 %). ОФ Zn обеспечила плавное прогрессирующее повышение А β -Л в течение всего эксперимента. В результате гистологической оценки установлено, что включение в рацион ОФ Zn приводило к усилению активности КБ с увеличением площади лимфоидных фолликулов на 64,5 % ($p \leq 0,01$) за счет расширения мозговых зон, а также к повышению клеточной плотности корковой зоны с большим числом макрофагов и митозов. В тимусе совокупно с расширением мозговой зоны

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ проект № 20-16-00078.

на 20,9 % наблюдалось большее число телец Гассалья, уплотнение клеток кортикального слоя и пролиферативная активность лимфоцитов с активизацией макрофагов. В селезенке при введении в рацион УДФ Zn отмечали укрупнение фолликулов за счет увеличения площади белой пульпы в 2,2 раза ($p \leq 0,05$). Таким образом, введение в рацион цыплят-бройлеров кросса Смена 7 органической и ультрадисперсной форм Zn позволило повысить бактерицидную активность сыворотки крови и увеличить активность лизоцима и β -лизинов, тем самым стимулируя естественную резистентность организма птицы. Реакция органов иммунной системы на применение различных форм цинка также была в большей степени выражена при включении в основной рацион УДФ и ОФ в сравнении с неорганической формой.

Ключевые слова: ультрадисперсные частицы, цыплята-бройлеры, кормление, цинк, иммунная система, тимус, селезенка, клоакальная бурса, микроструктура.

Проблемой современного птицеводства остается недостаточно высокая сохранность цыплят-бройлеров, что обусловлено, в частности, развитием иммуносупрессии. Причинами могут быть нарушения сбалансированности рационов, гиподинамия, скученность, технологические стрессы, а также высокая антигенная нагрузка в период активной иммунизации птицы. Для повышения адаптационной способности и иммунореактивности в последние годы с успехом используют биологически активные вещества: — витамины (1), аминокислоты и микроэлементы (2). Несомненный интерес представляет включение в кормовые добавки цинка (Zn), который обладает иммуноотропными свойствами, стимулирует активность иммунной и антиоксидантной систем, повышает продуктивность и сохранность животных (3).

В составе кормовых добавок используются разные формы Zn с неодинаковой усвояемостью: неорганическая, органическая и хелатная (4). Поскольку элементы в неорганических соединениях могут образовывать нерастворимые формы, которые не усваиваются (5), биодоступность Zn имеет ключевое значение при обеспечении потребности организма в этом элементе. Из-за низкой биодоступности неорганическая форма (НФ) Zn может вызвать дефицит элемента в организме, что приводит к снижению количества Т-клеток, продукции интерлейкинов и, как следствие, угнетению клеточного и гуморального иммунитета (6).

Перспективным подходом может стать применение наночастичек микроэлементов (7, 8), обладающих уникальными характеристиками, которые позволяют им быть конкурентными источниками химических элементов для минеральных кормовых добавок (9, 10). Высокая эффективность наночастичек металлов по сравнению с неорганическими солями и другими источниками подтверждается рядом исследований (11-13).

Показана целесообразность применения Zn при потенцировании клеточно-опосредованных иммунных реакций (14) как индуктора фагоцитоза и стимулятора гуморального ответа (15). Zn имеет решающее значение для развития и поддержания иммунной функции. Количество Zn — это критический фактор, который влияет на противовирусный иммунитет (16). Следовательно, Zn может быть полезным в иммунотерапии как дополнительный иммуноадьювант. Результат поискового запроса по ключевым словам «zinc, immunity» в системе PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) за последние 20 лет выводит более 4900 ссылок, что наглядно демонстрирует многообразную роль Zn в функционировании иммунной системы. Однако эффективность Zn зависит от множества факторов, в том числе от формы используемого вещества.

В настоящей работе впервые показано влияние цинка из разных источников на естественную резистентность и морфофункциональную реорганизацию иммунокомпетентных органов у цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Смена 7, а также установлено преимущество использования органической и ультрадисперсной форм цинка при кормлении цыплят по

сравнению с неорганической формой.

Нашей целью была сравнительная оценка эффективности применения различных форм цинка в рационе цыплят-бройлеров кросса Смена 7 как модуляторов иммунной системы на основании данных биохимических исследований и характеристики микроструктуры иммунокомпетентных органов.

Методика. Эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press, Washington DC, 1996). Все методы были одобрены комиссией по биоэтике Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий РАН (протокол № 3 от 21 марта 2018 года).

Источниками микроэлементов служили аспарагинат Zn (органическая форма, ОФ; ООО «В-Мин+», г. Сергиев Посад, Россия), минеральные соли $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (неорганическая форма, НФ; «Ленреактив», г. Санкт-Петербург, Россия) и порошок ультрадисперсных частиц Zn (УДФ Zn; ООО «Передовые порошковые технологии», г. Томск, Россия). УДФ Zn были получены методом электровзрыва проволоки в атмосфере аргона. Сертификация материалов включала электронную сканирующую и трансиллюминационную микроскопию на приборах JSM 7401F и JEM-2000FX («JEOL», Япония). Рентгенофазовый анализ выполняли на дифрактометре ДРОН-7 (НПО «Буревестник», Россия). По результатам аттестации гидродинамический радиус частиц составил $164 \pm 31,2$ нм, Z-потенциал — $25 \pm 0,5$ мВ, удельная поверхность — $5 \pm 1,6$ м²/г. Для получения лиозолей водные суспензии УДФ Zn обрабатывали в ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т (НПП Академприбор, Россия) при 35 кГц, 300/450 Вт, 10 мкА в течение 30 мин. Полученные лиозоли вводили в корм при ступенчатом перемешивании.

Исследования выполняли на цыплятах-бройлерах кросса Смена 7 ($n = 72$) в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН (г. Оренбург). В возрасте 2 нед на основании индивидуального взвешивания методом пар-аналогов сформировали три группы — контрольную и две опытные (по $n = 24$). Кормление осуществлялось с учетом рекомендаций (17) в соответствии с возрастными периодами.

Цыплята контрольной группы на протяжении всего опыта получали основной рацион, в котором Zn нормализовали введением его сульфата $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. В опытных группах в период с 14-х по 42-е сут сульфат Zn заменяли на УДФ Zn в дозе 49 мг/кг корма (I группа) или на аспарагинат Zn в той же дозировке (II группа). Подход к выбору дозировки определялся рекомендациями (17), однако с учетом информации о биодоступности элементов из органической и ультрадисперсной форм показатели были снижены на 30 %.

В возрасте 3, 4, 5 и 6 нед убивали по 6 цыплят из каждой группы. Отбирали образцы крови из подкрыльцовой вены. Биохимические исследования сыворотки крови осуществляли на автоматическом анализаторе CS-T240 («DIRUI Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих наборов для ветеринарных исследований DiaVetTest (АО «Диакон-ДС», Россия) в соответствии с протоколами производителей. Морфологический состав определяли с помощью автоматического гематологического анализатора URIT-2900 Vet Plus («URIT Medial Electronic Co., Ltd», Китай). Оценивали показатели естественной резистентности — бактерицидную актив-

ность сыворотки крови (БАСК), активность лизоцима (АЛ), активность β -лизинов (А β -Л), а также иммунологические показатели — показатель фагоцитов (ПФ) и фагоцитарный индекс (ФИ) (18).

Образцы клоакальной бурсы (КБ), тимуса, селезенки для морфологического анализа отбирали после убоя в конце эксперимента в возрасте 42 сут, фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафиновую смесь ГистоМикс («БиоВитрум», Россия). Морфологические характеристики определяли на гистологических срезах толщиной 5-6 мкм, изготовленных на полуавтоматическом микротоме МВП 01 («КБ Техном», Россия) и окрашенных гематоксилином и эозином (19). Общие структурные изменения оценивали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, на светооптическом микроскопе с программным обеспечением МТ 5300L («Meiji Techno Co., Ltd», Япония).

На срезах КБ определяли площадь фолликула и мозговой зоны, ширину корковой зоны; в селезенке — площадь красной и белой пульпы, плотность клеток красной и белой пульпы; в тимусе — площадь коркового и мозгового вещества, их соотношение (корковый индекс), плотность клеток красной и белой пульпы. Площадь структур определяли на 125000 мкм² счетной сетки, плотность — на 1 мм². Лабораторные испытания проводили в Центре коллективного пользования биологических систем и агротехнологий РАН (ЦКП БСТ РАН).

При статистической обработке данных использовали программный пакет Statistica 10.0 («StatSoft, Inc.», США) и Microsoft Excel. Вычисляли средние значения показателей (M) и стандартные ошибки средних ($\pm SEM$). Различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Если распределение отличалось от нормального, то использовали U -критерий Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты. В 3-недельном возрасте при добавлении ОФ Zn в рацион (II группа) у цыплят отмечали повышение содержания лейкоцитов в крови на 37,5 % ($p \leq 0,05$) в сравнении с контролем. К 4-недельному возрасту число лейкоцитов увеличивалось и при введении УДФ Zn на 40,7 % ($p \leq 0,05$). Повышение происходило за счет лимфоцитов и моноцитов. Так, в 3-недельном возрасте разница по числу лимфоцитов составила 10,3 % для I опытной группы и 8,7 % для II опытной группы. Содержание моноцитов значимо ($p \leq 0,05$) различалось только в пользу II группы в 4-недельном возрасте (табл. 1). Подобное увеличение числа лимфоцитов в крови отмечается при усилении иммунореактивности птицы, поскольку лимфоциты служат основным исполнительным звеном в клеточной и гуморальной защите организма. Увеличение числа моноцитов при использовании ОФ Zn может свидетельствовать об активации моноцитарно-фагоцитарной системы и, следовательно, повышении защитных свойств организма цыплят-бройлеров (20). К концу эксперимента в опытных группах содержание лейкоцитов было ниже контроля. Все показатели белых клеток крови укладывались в нормативные значения.

Применение ОФ Zn (II группа) приводило к статистически значимому ($p \leq 0,05$) повышению активности БАСК в 3-недельном возрасте на 13,4 % и в конце эксперимента на 10,1 % по сравнению с контролем. Введение УДФ Zn (I группа) способствовало повышению БАСК на более поздних этапах эксперимента: в 4-недельном возрасте на 16,7 % ($p \leq 0,01$), в 5-недельном возрасте на 14,6 % ($p \leq 0,01$), к концу эксперимента разница

составила 5,8 %.

1. Содержание белых клеток в крови цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Смена 7 разного возраста при скармливании различных форм Zn ($n = 6$, $M \pm SEM$, опыт в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, г. Оренбург, 2020 год)

Группа	Возраст, нед			
	3	4	5	6
	Лейкоциты, $\times 10^9$ /л (норма 20,0-40,0)			
Контрольная (НФ)	18,45 \pm 1,850	24,30 \pm 1,921	26,33 \pm 2,998	35,73 \pm 1,307
I опытная (УДФ)	22,30 \pm 1,188	34,20 \pm 2,112*	25,83 \pm 0,581	27,27 \pm 1,946*
II опытная (ОФ)	25,37 \pm 1,159*	27,33 \pm 1,700	28,60 \pm 1,517	30,90 \pm 1,361
	Лимфоциты, % (норма 52-70)			
Контрольная (НФ)	79,55 \pm 4,950	85,70 \pm 1,343	89,17 \pm 1,281	88,70 \pm 1,102
I опытная (УДФ)	87,80 \pm 1,686*	87,93 \pm 2,331	87,37 \pm 1,235	89,47 \pm 1,674
II опытная (ОФ)	86,53 \pm 1,317*	90,23 \pm 1,441*	88,27 \pm 1,906	89,07 \pm 1,667
	Моноциты, % (норма 4,0-10,0)			
Контрольная (НФ)	5,30 \pm 0,900	6,67 \pm 0,176	6,20 \pm 0,529	6,33 \pm 0,491
I опытная (УДФ)	6,80 \pm 0,436	6,63 \pm 0,996	6,70 \pm 0,436	6,03 \pm 0,203
II опытная (ОФ)	6,20 \pm 0,721	7,60 \pm 0,173*	6,33 \pm 0,393	6,23 \pm 0,120

Примечание. НФ — неорганическая форма, УДФ — ультрадисперсная форма, ОФ — органическая форма. Описание групп см. в разделе «Методика».

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Некоторые белые клетки крови, в частности моноциты, служат продуцентами факторов неспецифической защиты организма, в том числе лизоцима (21). У цыплят на фоне применения УДФ Zn АЛ сыворотки крови повысилась в 4-недельном возрасте на 8,5 % ($p \leq 0,05$), в 5-недельном — на 8,2 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. Добавление в рацион ОФ Zn повышало АЛ на 10,0 % ($p \leq 0,05$) и 8,8 % ($p \leq 0,05$) соответственно в 5-недельном и 6-недельном возрасте (рис. 1). Увеличение содержания лизоцима в крови птицы в разные возрастные периоды способствовало повышению неспецифической резистентности организма.

Различные формы Zn оказывали влияние и на показатель Аβ-Л. Повышение активности β-лизинов на 16,1 % ($p \leq 0,05$) отмечали в 5-недельном возрасте при скармливании УДФ Zn с последующим снижением к концу эксперимента. ОФ Zn обеспечила плавное повышение активности в течение всего эксперимента (см. рис. 1). Будучи одной из важных бактерицидных систем сыворотки крови, β-Л обладают термостабильностью и избирательностью в отношении грамположительных бактерий. По своей природе β-Л — это катионный белок тромбоцитарного происхождения (22). Повышение Аβ-Л в опытных группах может свидетельствовать об усилении устойчивости организма птицы к грамположительным микроорганизмам (23).

Воздействие Zn на защитные реакции организма реализовывалось за счет повышения АЛ, β-Л и, как следствие, БАСК — интегрального показателя естественной резистентности гуморального типа, который свидетельствует о способности крови к самоочищению. Снижение БАСК наблюдается чаще, чем повышение, что характерно в основном для различных стрессовых ситуаций, нарушения условий кормления и содержания, возникновения заболеваний (24). ОФ и УДФ Zn в большей степени, чем НФ, стимулировали БАСК.

Использование Zn способствовало повышению фагоцитарной активности, выраженной как ПФ, что проявлялось в увеличении ПФ в I опытной группе на 10,4 ($p \leq 0,05$) и 19,5 % ($p \leq 0,05$) соответственно в 3- и 4-недельном возрасте по сравнению с контролем. Во II опытной группе ПФ в 4- и 5-недельном возрасте превысил на 8,6 % ($p \leq 0,05$) показатели контрольных аналогов (рис. 2).

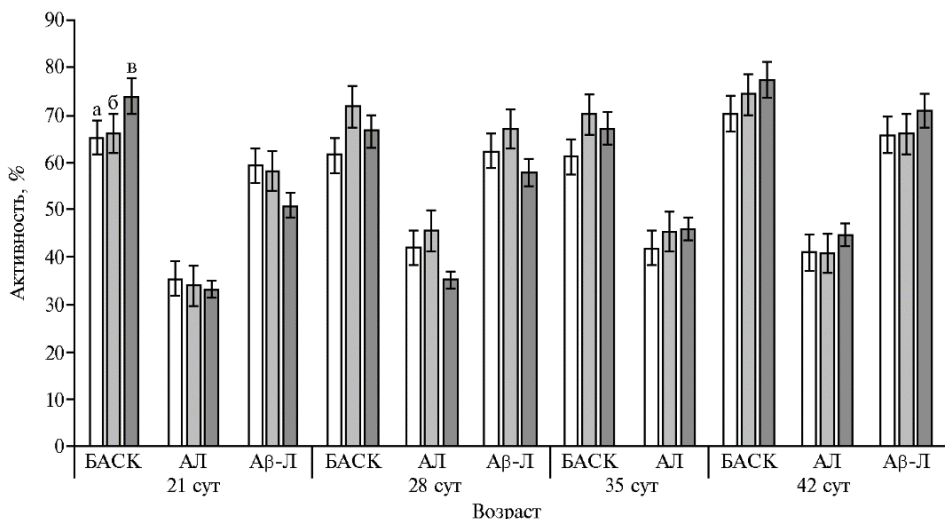


Рис. 1. Показатели неспецифической резистентности цыплят-бройлеров (*Gallus gallus L.*) кросса Смена 7 разного возраста при скармливание различных форм Zn: БАСК — бактерицидная активность сыворотки крови, АЛ — активность лизоцима, Аβ-Л — активность β-лизинов; а — контрольная, б — I опытная группа, в — II опытная группа ($n = 6$, $M \pm SEM$, опыт в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, г. Оренбург, 2020 год). Описание групп см. в разделе «Методика».

*, ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

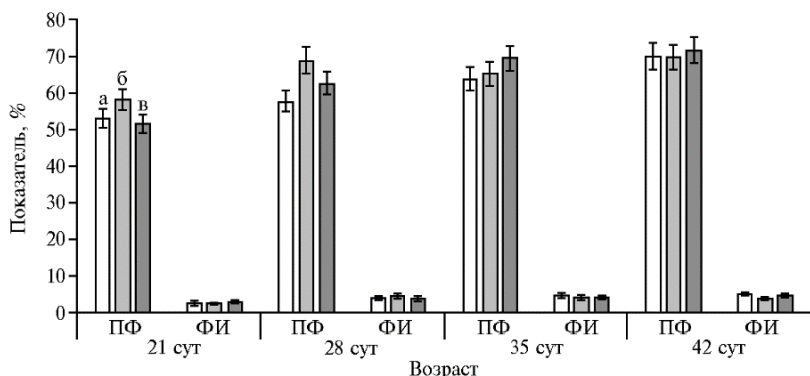


Рис. 2. Показатели фагоцитарной активности крови цыплят-бройлеров (*Gallus gallus L.*) кросса Смена 7 разного возраста при скармливание различных форм Zn: ПФ — показатель фагоцитоза, ФИ — фагоцитарный индекс; а — контрольная, б — I опытная группа, в — II опытная группа ($n = 6$, $M \pm SEM$, опыт в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, г. Оренбург, 2020 год). Описание групп см. в разделе «Методика».

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Интенсивность фагоцитоза, выраженная через ФИ, в I опытной группе превышала контрольные значения в 4-недельном возрасте на 19,1 % ($p \leq 0,05$), а к концу эксперимента снижалась. Различия с контролем во II опытной группе составили в 3-недельном возрасте 16,6 % ($p \leq 0,05$), к концу эксперимента ФИ снижался на 12,2 % относительно контроля (рис. 2).

Для понимания причинно-следственных связей и особенностей функционирования иммунной системы необходимо оценить не только неспецифические факторы резистентности, но и исследовать гистологическую структуру иммунокомпетентных органов. Поскольку КБ играет ключевую роль в формировании иммунитета птицы, изучение ее морфофункциональных характеристик в связи с поиском эффективных методов коррекции минерального питания, рассматривается как одна из важнейших задач.

Так, микроструктура КБ у цыплят I группы (рис. 3, А) от контроля (см. рис. 3, В) отличалась умеренным укрупнением фолликулов на 15,4 % ($p \leq 0,05$) (табл. 2) с увеличением ширины корковой зоны. В лимфоидных клетках корковой зоны наблюдались многочисленные митозы. В клетках железистого эпителия были видны мелкие вакуоли, ядра вытянутой формы расположены базально, отмечалась умеренная очаговая пролиферация. Выявлялись кисты небольших размеров.

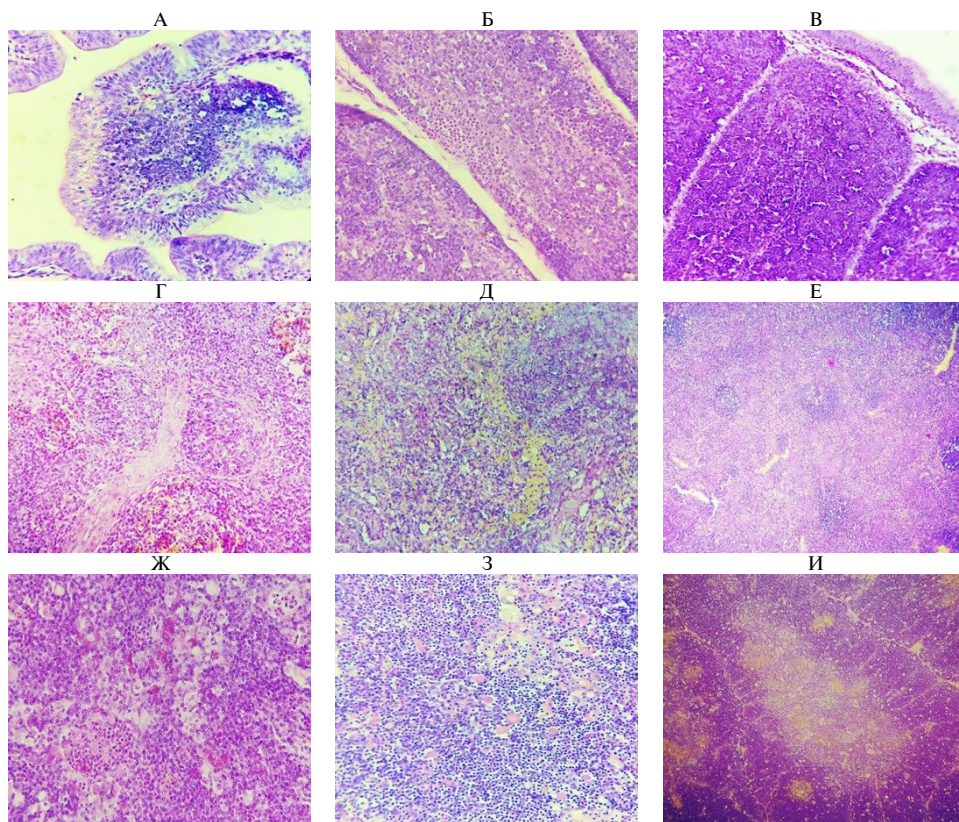


Рис. 3. Микроструктура клоакальной бursы (А, Б, В), селезенки (Г, Д, Е) и тимуса (Ж, З, И) цыплят-бройлеров (*Gallus gallus L.*) кросса Смена 7 в возрасте 42 сут (окончание эксперимента) при скормлировании различных форм Zn: А, Г, Ж — I опытная группа (А — усиленная пролиферация эпителия, увеличение $\times 100$; Г — четкие границы фолликулов, полнокровие красной пульпы с участками клеточной разреженности, увеличение $\times 400$; Ж — корковый слой со скоплением макрофагов, эозинофильных гранулоцитов, увеличение $\times 400$); Б, Д, З — II опытная группа (Б — широкая мозговая зона, большое число эозинофильных гранулоцитов в узкой корковой зоне, увеличение $\times 400$; Д — гиперплазия лимфоидной ткани без четких границ с красной пульпой, увеличение $\times 400$; З — большое число лимфоидных клеток и телец Гассала, увеличение $\times 400$); В, Е, И — контрольная группа (увеличение $\times 100$) (опыт в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, г. Оренбург, 2020 год). Окрашивание гематоксилином и эозином, микроскоп МТ 5300L («Meiji Techno Co., Ltd», Япония).

Общая гистологическая структура КБ во II опытной группе отличалась от контроля увеличением площади фолликулов на 64,5 % ($p \leq 0,01$), преимущественно за счет увеличения площади их мозговой зоны (до 82,7 %) (см. табл. 2), а также более плотной заселенностью клетками обеих зон. В отдельных фолликулах обнаруживались мелкие кисты. В узкой корковой зоне отмечалось большое число эозинофильных гранулоцитов (см. рис. 3, Б). Среди лимфоидных клеток было выявлено множество макрофагов и митотически активных клеток. Мозговая зона была широкой. Увеличение полезной площади фолликулярного аппарата и уменьшение — соединительной ткани

стромы КБ свидетельствовали об активации реакции и, как следствие, о повышении адаптивного резерва. Известно, что Zn может улучшать продуктивность и гистоморфологию иммунных органов (25).

2. Морфометрическая характеристика микроструктур клоакальной бурсы, селезенки и тимуса цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Смена 7 в возрасте 42 сут при скармливании различных форм Zn ($n = 6, M \pm SEM$, опыт в условиях вивария ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, г. Оренбург, 2020 год)

Показатель	Группа		
	контрольная (НФ)	I опытная (УДФ)	II опытная (ОФ)
К л о а к а л ь н а я б у р с а			
Площадь фолликула, мм ²	0,039±0,0010	0,045±0,0026	0,063±0,0018**
Площадь мозговой зоны фолликула, мм ²	0,029±0,0008	0,032±0,0015*	0,053±0,0019**
Доля мозговой зоны в фолликуле, %	74,7±1,32	70,9±0,99	83,6±1,69
Ширина корковой зоны фолликула, мкм	34,16±1,081	57,00±0,950***	32,50±0,510
С е л е з е н к а			
Площадь красной пульпы, мм ²	0,175±0,0121	0,089±0,0061*	0,118±0,0081
Площадь белой пульпы, мм ²	0,075±0,0081	0,162±0,0080*	0,133±0,0082*
Плотность клеток красной пульпы	2051,2±56,10	1856,0±49,23	2329,6±62,83
Плотность клеток белой пульпы	1865,6±52,33	4201,6±87,21***	3180,8±54,63***
Т и м у с			
Площадь корковой зоны, мм ²	0,665±0,0281	0,545±0,0113*	0,626±0,0126
Площадь мозговой зоны, мм ²	0,583±0,0184	0,705±0,0158*	0,624±0,0191
Корковый индекс	1,14±0,093	0,77±0,019	1,00±0,030
Плотность клеток корковой зоны	2808,0±59,21	3690,7±51,73***	4805,3±65,01***
Плотность клеток мозговой зоны	1749,3±44,91	2405,3±50,13**	2728,0±60,63**

Примечание. НФ — неорганическая форма, УДФ — ультрадисперсная форма, ОФ — органическая форма. Описание групп см. в разделе «Методика».
*, **, *** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$.

Если селезенку млекопитающих рассматривают в первую очередь в качестве депо крови, то селезенка птиц служит исключительно иммунокомпетентным органом (26). При оценке ее микроструктуры в нашем эксперименте была выявлена активация реакции белой пульпы в I группе, проявляющаяся в укрупнении фолликулов и увеличении их числа, а также в более плотном расположении клеток по сравнению с контролем в 2,3 раза ($p \leq 0,001$) с преобладанием зрелых лимфоцитов, лимфобластов, плазматических и макрофагальных клеток. Площадь белой пульпы при этом увеличилась в 2,2 раза ($p \leq 0,05$) (см. табл. 2). В красной пульпе, наоборот, наблюдалось снижение активности, на что указывало наличие зон с оскудением клеточного содержимого и обнажением стромы органа (см. рис. 3, Г). Среди преобладающих лимфоидных клеток пульпы в большом количестве выявляли макрофаги. Содержание лимфобластов и плазмоцитов заметно снижалось.

Морфофункциональное состояние селезенки у цыплят из II опытной группы (см рис. 3, Д) по сравнению с контролем (см. рис. 3, Е) характеризовалось усилением активности обеих зон паренхимы. Площадь белой пульпы увеличивалась в 1,7 раза ($p \leq 0,05$). Плотность клеток фолликулов повышалась на 70,5 % ($p \leq 0,001$) по сравнению с контролем, среди них присутствовали макрофагальные клетки и незрелые форм лимфоцитов (см. табл. 2). В красной пульпе отмечалось общее полнокрое и повышение клеточной плотности. В результате активного участия селезенки в иммунных реакциях закономерны реактивные структурные изменения этого органа (25). В нашем эксперименте в большей степени подобные изменения возникали на фоне введения ОФ Zn.

Особенности гистологического строения тимуса у птицы из I группы (см. рис. 3, Ж) по сравнению с контрольной (см. рис. 3, И) заключались в расширении площади мозговой зоны на 20,9 % ($p \leq 0,05$) и увеличении

плотности клеток как в корковом, так и в мозговом слое соответственно на 31,4 ($p \leq 0,001$) и 37,5 % ($p \leq 0,01$). В корковом слое наблюдалось значительное число элементов макрофагальной системы с видимыми минимальными дистрофическими изменениями, формирующими небольшие скопления. Были заметны признаки пролиферативных процессов лимфатических клеток корковой зоны. Для мозговой зоны было характерно незначительное число телец Гассала малых размеров.

Общая гистологическая структура тимуса во II группе (см. рис. 3, 3) оказалась сходна с морфологической картиной в I опытной группе. Наблюдалось повышение иммунологической активности тимуса, выраженное в расширении мозговой зоны, увеличении плотности клеток в корковой и мозговой зонах соответственно на 71,9 ($p \leq 0,001$) и 55,9 % ($p \leq 0,001$) (см. табл. 2) и числа клеток в состоянии митоза в сравнении с контролем.

Описанные эффекты могли быть результатом хорошей абсорбции Zn из ОФ и УДФ в кишечнике цыплят-бройлеров. К тому же, по-видимому, ОФ Zn лучше преодолевает антагонистические и другие ингибирующие факторы пищеварительной системы, поэтому расширяются границы абсорбционного фонда элемента (27).

В работах других авторов показано, что коррекция рациона Zn (28, 29) и другими веществами, пре- и пробиотиками (30), масляной кислотой (31), бутиратом натрия (32) приводит к изменениям микроархитектоники лимфоидных органов и кишечной стенки: увеличиваются длина и площадь поверхности ворсинок, число бокаловидных клеток.

Поскольку ингредиентный состав рациона в нашем эксперименте во всех группах был одинаковым, за исключением разных форм Zn, предполагается, что стимуляция иммунологической реакции в опытных группах по сравнению с контролем была результатом структурных изменений органов иммунной системы — селезенки, тимуса и КБ.

Поступающий с кормом Zn характеризуется хорошей абсорбцией в кишечнике и, влияя на иммунную систему, задействует ряд механизмов. В целом они схожи для многих микроэлементов и заключаются в действии на специфические рецепторы, во влиянии на процессы фагоцитоза, апоптоза, хемотаксиса, адгезии, активность ферментов, гормонов, белки-переносчики, в усилении продукции иммуноглобулинов. Катионы Zn^{2+} способны стимулировать пролиферацию клеток иммунокомпетентных органов, в частности селезенки (15, 33). Zn потенцирует клеточно-опосредованные защитные реакции организма по отношению к бактериям и вирусам (14).

Таким образом, введение в рацион цыплят-бройлеров кросса Смена 7 органической (ОФ) и ультрадисперсной (УДФ) форм Zn позволило повысить бактерицидную активность сыворотки крови и увеличить активность лизоцима и β -лизинов, тем самым стимулируя естественную резистентность организма птицы. В эксперименте не установлено патологической картины белой крови. Тенденция увеличения лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов в возрасте 3-4 нед в большей степени отмечена на фоне введения ОФ Zn. Однако УДФ Zn способствовала повышению бактерицидной активности сыворотки крови в диапазоне от 5,8 до 16,7 % и АЛ на 8,2 % на более поздних этапах эксперимента по сравнению с контролем. Тенденция к увеличению активности β -лизинов была зарегистрирована в 5-недельном возрасте с последующим снижением к концу эксперимента. Применение органической формы Zn приводило к статистически значимому ($p \leq 0,01$) повышению бактерицидная активность сыворотки крови на 13,4 % в 3-недельном возрасте и лизоцима на 8,8 % в конце эксперимента. ОФ Zn обеспечила плавное прогрессирующее повышение А β -Л в течение всего

эксперимента. В результате гистологической оценки установлено, что использование ОФ Zn приводило к усилению активности клоакальной бурсы с увеличением площади лимфоидных фолликулов на 64,5 % ($p \leq 0,01$) за счет расширения мозговых зон и к повышению клеточной плотности корковой зоны с большим числом макрофагов и митозов. В тимусе вместе с расширением мозговой зоны на 20,9 % наблюдалось большее число телец Гассала, уплотнение клеток кортикального слоя и пролиферативная активность лимфоцитов с активацией макрофагов. В селезенке при введении УДФ Zn отмечали укрупнение фолликулов за счет увеличения площади белой пульпы в 2,2 раза ($p \leq 0,05$). В целом можно утверждать, что реакция органов иммунной системы на применение различных форм цинка в большей степени была выражена при включении в основной рацион УДФ Zn и ОФ в Zn сравнении с неорганической формой.

¹ФГБНУ ФНЦ биологических систем
и агротехнологий РАН,
460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,
e-mail: Sizova.L78@yandex.ru ✉, k.nechit@mail.ru;
²ФГБОУ ВО Оренбургский государственный
университет,
460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13,
e-mail: sergey_ru01@mail.ru

Поступила в редакцию
28 июня 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 2, pp. 373-385

THE EFFECTIVENESS OF VARIOUS FORMS OF Zn AS STIMULATORS OF THE IMMUNE RESPONSE IN BROILER CHICKENS (*Gallus gallus* L.)

E.A. Sizova¹ ✉, S.A. Miroshnikov², K.S. Nechitailo¹

¹Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, 29, ul. 9 Yanvaryu, Orenburg, 460000 Russia, e-mail Sizova.L78@yandex.ru (✉ corresponding author), k.nechit@mail.ru;

²Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia, e-mail sergey_ru01@mail.ru

ORCID:

Sizova E.A. orcid.org/0000-0002-5125-5981

Nechitailo K.S. orcid.org/0000-0002-8755-414X

Miroshnikov S.A. orcid.org/0000-0003-1173-1952

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially from the Russian Science Foundation (project No. 20-16-00078)

Final revision received June 28, 2022

doi: 10.15389/agrobiol.2023.2.373eng

Accepted August 12, 2022

Abstract

A significant problem of modern poultry farming is insufficient viability of broiler chickens due to various reasons, including immunosuppression. Various biologically active substances and trace elements are successfully used to increase the adaptive capacity and immunoreactivity of birds. The use of zinc (Zn) in feed additives which has immunotropic properties, stimulates immune and antioxidant systems, increases the productivity and safety of animals is of undoubted interest. Here, for the first time the influence of zinc from different sources on natural resistance and morphofunctional reorganization of immunocompetent organs of Smena 7 cross broiler chickens (*Gallus gallus* L.) was shown. These data also point to the advantage of organic and ultrafine dietary forms of zinc for chick feeding compared to the inorganic form. Our goal was to compare the effectiveness of using different forms of zinc in the diet as modulators of the immune system based on biochemical parameters and characterization of the microstructure of immunocompetent organs. Studies were performed on broiler chickens of Smena 7 cross (three groups, 24 animals in each group) in the vivarium of the Federal Research Center of Biological Systems and Agrotechnologies RAS (Orenburg). Sources of trace elements were asparaginate Zn (organic form, OF; LLC V-Min+, Sergiev Posad, Russia), mineral salts $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (inorganic form, IF; Lenreaktiv, St. Petersburg, Russia) and powder of ultradispersed Zn particles (UDP Zn; LLC Advanced Powder Technologies, Tomsk, Russia). Chickens in the control group received a basic diet throughout the experiment, in which Zn was normalized by the introduction of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. In the test groups from day 14 to day 42 Zn sulphate was replaced with UDP Zn at a dose of 49 mg/kg feed (group I) or with asparaginate Zn at the same dose (group II). Samples for

analysis were collected after poultry slaughtering at 3, 4, 5, and 6 weeks of age. Biochemical studies of blood serum were performed on an automatic analyzer CS-T240 (DIRUI Industrial Co., Ltd., China) using commercial kits for veterinary research DiaVetTest (JSC Diakon-DS, Russia). Morphological composition was determined using an automatic hematological analyzer URIT-2900 Vet Plus (URIT Medial Electronic Co., Ltd., China). Indices of natural resistance, i.e., the bactericidal activity of blood serum (BABS), lysozyme activity (AL), β -lysine activity (β -L), and immunological indices, the phagocyte number (PN) and phagocytic index (PI) were evaluated. Morphological characteristics of cloacal bursa (CB), thymus and spleen were determined on 5-6 microns thick histological sections stained with hematoxylin and eosin. General structural changes were assessed on paraffin sections stained with hematoxylin and eosin using a light-optical microscope with MT 5300L software (Meiji Techno Co., Ltd., Japan). The area of the follicle and medullary region, the width of the cortical zone were determined in the CB sections; the area of red and white pulp, cell density of red and white pulp in the spleen; the area of cortical and brain substance, their ratio (cortical index), cell density of red and white pulp in the thymus. The area of structures was determined at 125000 μm^2 , density at 1 mm^2 . At 3 weeks of age, chickens of group II showed a 37.5 % ($p \leq 0.05$) increase in leukocytes compared to control. By 4 weeks of age, the index also increased by 40.7% ($p \leq 0.05$) when UDP Zn was fed. The increase was due to lymphocytes and monocytes. In the test groups, by the end of the experiment, the number of leukocytes was lower than the control. All indicators of white blood cells were within the normal range. Introduction of UDP Zn contributed to an increase in BABS in the range from 5.8 % to 16.7 % and AL by 8.2 % in the later stages of the experiment compared to control. The tendency to an increase in β -L was recorded at 5 weeks of age with a subsequent decrease by the end of the experiment. Application of OF Zn led to a statistically significant ($p \leq 0.01$) increase in the activity of BABS by 13.4 % at 3-weeks of age and AL at the end of the experiment (by 8.8 %). The OF Zn provided a smooth progressive increase in β -L throughout the experiment. Histological evaluation revealed that dietary OF Zn increased CB activity with an increase in lymphoid follicle area by 64.5 % ($p \leq 0.01$) due to expansion of medulla zones, as well as increased cellular density of the cortical zone with a large number of macrophages and mitoses. In the thymus, together with a 20.9 % expansion of the medullary zone, there was a greater number of Hassall's corpuscles, thickening of cells in the cortical layer and proliferative activity of lymphocytes with activation of macrophages. In the spleen after the introduction of UDP Zn, enlargement of follicles by increasing the area of white pulp 2.2-fold ($p \leq 0.05$) was noted. Thus, Smena 7 broiler chickens fed organic and ultradisperse Zn additives exhibit higher blood bactericidal activity and activity of lysozyme and β -lysines, which indicates the stimulation of natural resistance. The response of the immune system to Zn was also more pronounced for dietary UDP Zn and OF Zn compared to inorganic form.

Keywords: ultrafine particles, chickens, feeding, zinc, immune system, thymus, spleen, cloacal bursa, microstructure.

REFERENCES

1. Akbari Moghaddam Kakhki R., Bakhshalinejad R., Zoidis E. Interactive effects of α -tocopheryl acetate and zinc supplementation on the antioxidant and immune systems of broilers. *British Poultry Science*, 2018, 59(6): 679-688 (doi: 10.1080/00071668.2018.1521510).
2. Jarosz Ł., Marek A., Grądziński Z., Kwiecień M., Żylińska B., Kaczmarek B. Effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulfate on cytokine and immunoglobulin gene expression profiles in chicken intestinal tissue. *Poultry Science*, 2017, 96(12): 4224-4235 (doi: 10.3382/ps/pex253).
3. Rao S.V.R., Prakash B., Raju M.V.L.N., Panda A.K., Kumari R.K., Reddy E.P.K. Effect of supplementing organic forms of zinc, selenium and chromium on performance, anti-oxidant and immune responses in broiler chicken reared in tropical summer. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2016, 172(2): 511-520 (doi: 10.1007/s12011-015-0587-x).
4. Perez V., Shanmugasundaram R., Sifri M., Parr T.M., Selvaraj R.K. Effects of hydroxychloride and sulfate form of zinc and manganese supplementation on superoxide dismutase activity and immune responses post lipopolysaccharide challenge in poultry fed marginally lower doses of zinc and manganese. *Poultry Science*, 2017, 96(12): 4200-4207 (doi: 10.3382/ps/pex244).
5. Egorov I., Papazyan T. *Ptitssevodstvo*, 2007, 3: 9-11 (in Russ.).
6. Prasad A.S., Beck F.W., Bao B., Fitzgerald J.T., Snell D.C., Steinberg J.D., Cardozo L.J. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 85(3): 837-844 (doi: 10.1093/ajcn/85.3.837).
7. Sizova E., Miroshnikov S., Lebedev S., Usha B., Shabunin S. The use of nanoscale metals in poultry diet as a mineral feed additive. *Animal Nutrition*, 2020, 6(2): 185-191.
8. Fisinin V.I., Miroshnikov S.A., Sizova E.A., Ushakov A.S., Miroshnikova E.P. Metal particles as trace-element sources: current state and future prospects. *World's Poultry Science Journal*, 2018,

74(3): 523-540 (doi: 10.1017/S0043933918000491).

9. Sizova E., Miroshnikov S., Balakirev N. Forecast of productive and biological effects of metal nanoparticles according to tolerance index. *International Journal of Geomate*, 2019, 17(61): 141-148 (doi: 10.21660/2019.61.8217).
10. Gubajdullina I.Z., Gavrih I.A., Lebedev S.V. Effect of metallic nanoparticles on exchange of chemical elements in broiler chickens. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 341(1): 012169 (doi: 10.1088/1755-1315/341/1/012169).
11. Yausheva E., Miroshnikov S., Sizova E., Miroshnikova E., Levahin V. Comparative assessment of effect of copper nano- and microparticles in chicken. *Oriental Journal of Chemistry*, 2015, 31(4): 2327-2336 (doi: 10.13005/ojc/310461).
12. Mroczek-Sosnowska N., Łukasiewicz M., Wnuk A., Sawosz E., Niemiec J., Skot A., Jaworski S., Chwalibog A. In ovo administration of copper nanoparticles and copper sulfate positively influences chicken performance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(9): 3058-3062 (doi: 10.1002/jsfa.7477).
13. Ognik K., Sembratowicz I., Cholewińska E., Jankowski J., Kozłowski K., Jusiewicz J., Zduńczyk Z. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in their drinking water on the immune and antioxidant status of the blood. *Animal Science Journal*, 2018, 89(3): 579-588 (doi: 10.1111/asj.12956).
14. Read S.A., Obeid S., Ahlenstiel C., Ahlenstiel G. The role of zinc in antiviral immunity. *Advances in Nutrition*, 2019, 10(4): 696-710 (doi: 10.1093/advances/nmz013).
15. Kidd M.T., Ferket P.P., Qureshi M.A. Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. *World's Poultry Science Journal*, 1996, 52(3): 309-324 (doi: 10.1079/WPS19960022).
16. Kumar A., Kubota Y., Chernov M., Kasuya H. Potential role of zinc supplementation in prophylaxis and treatment of COVID-19. *Medical Hypotheses*, 2020, 144: 109848 (doi: 10.1016/j.mehy.2020.109848).
17. Fisinin V.I., Egorov I.A., Okolelova T.M., Imangulov Sh.A. *Nauchnye osnovy kormleniya sel'skokhozyaystvennoy ptitsy* [The scientific basis of poultry feeding]. Sergiev Posad, 2009 (in Russ.).
18. Sadovnikov N.V., Pridybaylo N.D., Vereshchak N.A., Zaslouov A.S. *Obshchie i spetsial'nye metody issledovaniya krovi ptits promyshlennykh krossov*. [General and special methods for the study of the blood of poultry of industrial crosses] Ekaterinburg—St. Petersburg, 2009 (in Russ.).
19. Semchenko B.V., Barashkova S.A., Artem'eva V.N. *Gistologicheskaya tekhnika* [Histological technique]. Omsk, 2003 (in Russ.).
20. Rao S., Kota L. N., Li Z., Yao Y., Tang J., Mao C., Jain S., Xu Y., Xu Q. Accelerated leukocyte telomere erosion in schizophrenia: Evidence from the present study and a meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research*, 2016, 79: 50-56 (doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.04.010).
21. Fisinin V.I., Ushakov A.S., Duskaev G.K., Kazachkova N.M., Nurzhanov B.S., Rakhmatullin Sh.G., Levakhin G.I. Mixtures of biologically active substances of oak bark extracts change immunological and productive indicators of broilers. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(2): 385-392 (doi: 10.15389/agrobiologi.2018.2.385eng).
22. Paraskeuas V., Fegeros K., Palamidi I., Hunger C., Mountzouris K.C. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different phylogenetic levels. *Animal Nutrition*, 2017, 3(2): 114-120 (doi: 10.1016/j.aninu.2017.01.005).
23. Beregovaya N.G., Gerasimenko V.V. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2018, 1: 41-52 (in Russ.).
24. Karimzadeh S., Rezaei M., Yansari A.T. Effects of different levels of canola meal peptides on growth performance and blood metabolites in broiler chickens. *Livestock Science*, 2017, 203: 37-40 (doi: 10.1016/j.livsci.2017.06.013).
25. Shah M., Zaneb H., Masood S., Khan I., Sikandar A., Ashraf S., Rehman H.F., Usman M.M., Khan F.A., Amanullah H., Rehman H. Effect of zinc and probiotics supplementation on performance and immune organs morphology in heat stressed broilers. *South African Journal of Animal Science*, 2018, 48(6): 1017-1025 (doi: 10.4314/sajas.v48i6.3).
26. Vinogradova E.V., Usenko V.V., Tarabrin I.V. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2013, 44: 146-151 (in Russ.).
27. Arsanukaev D.L., Zaynalabdjeva Kh.M., Tsentroevev M.V., Mantaev Kh.Z., Israilova S.A. *Vestnik Akademii nauk Chechenskoj Respubliki*, 2013, 3(20): 40-47 (in Russ.).
28. Shah M., Zaneb H., Masood S., Khan R.U., Mobashar M., Khan I., Din S., Khan M.S., Rehman H.U., Tinelli A. Single or combined applications of zinc and multi-strain probiotic on intestinal histomorphology of broilers under cyclic heat stress. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(2): 473-480 (doi: 10.1007/s12602-019-09561-6).
29. Shah M., Zaneb H., Masood S., Khan R.U., Ashraf S., Sikandar A., Rehman H.F.U., Rehman H.U. Effect of dietary supplementation of zinc and multi-microbe probiotic on growth traits and alteration of intestinal architecture in broiler. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(3): 931-937 (doi: 10.1007/s12602-018-9424-9).

30. Ashraf S., Zaneb H., Yousaf M.S., Ijaz A., Sohail M.U., Muti S., Usman M.M., Ijaz S., Rehman H. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2013, 97(s1): 68-73 (doi: 10.1111/jpn.12041).
31. Qaisrani S.N., van Krimpen M.M., Kwakkel R.P., Verstegen M.W.A., Hendriks W.H. Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers. *Poultry Science*, 2015, 94(9): 2152-2164 (doi: 10.3382/ps/pev003).
32. Sikandar A., Zaneb H., Younus M., Masood S., Aslam A., Khattak F., Ashraf S., Yousaf M. S., Rehman H. Effect of sodium butyrate on performance, immune status, microarchitecture of small intestinal mucosa and lymphoid organs in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(5): 690-699 (doi: 10.5713/ajas.16.0824).
33. Kudrin A.V., Skal'nyy A.V., Zhavoronkov A.A., Skal'naya M.G., Gromova O.A. *Immunofarmakologiya mikroelementov* [Immunopharmacology of trace elements]. Moscow, 2000 (in Russ.).