

UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ

Domeniul de doctorat: MEDICINĂ VETERINARĂ

Specializarea: Morfologie normală și patologică

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat, Prof. univ. dr. Carmen Solcan

Doctorand, Adrian Bondar

UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ

Domeniul de doctorat: MEDICINĂ VETERINARĂ

Specializarea: Morfologie normală și patologică

TEZĂ DE DOCTORAT

**Efectul unor antioxidanți naturali asupra țesutului limfoid asociat
tubului digestiv la păsări crescute în sistem gospodăresc**

Conducător de doctorat, Prof. univ. dr. Carmen Solcan

Doctorand, Adrian Bondar

2023

UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES „ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Doctoral field: VETERINARY MEDICINE

Specialization: Normal and pathological morphology

DOCTORAL THESIS

**Effect of natural antioxidants on digestive tract-associated lymphoid
tissue in free-range birds**

Conducător de doctorat, Prof. univ. dr. Carmen Solcan

Doctorand, Adrian Bondar

2023

CUPRINS

INTRODUCERE	1
INTRODUCTION	3
REZUMAT	5
SUMMARY	11
Partea I. PARTICULARITĂȚI ANATOMICE ȘI MORFOFIZIOLOGICE ALE TUBULUI DIGESTIV LA PĂSĂRI.....	16
I.1 Morfofiziologia tractului intestinal la păsări	17
I.1.1. Particularitățile fiziologice ale intestinului la păsări	19
I.1.2. Histologia funcțională a cecumului la păsări	22
I.2. Bariera epitelială intestinală la păsări.....	23
I.2.1. Permeabilitatea intestinală	25
I.2.2. Transportul transcelular	26
I.2.2. Transportul paracelular	28
I.3. Țesutul limfoid asociat intestinului la păsări	31
I.3.1. Homeostazia mucoasei și funcția de barieră	35
I.3.2. Răspunsul imunitar la nivelul intestinului la păsări	39
I.3.3. Mecanisme de protecție ale mucoasei intestinale la păsări	45
I.4. Antioxidanți naturali utilizați ca suplimente nutritive în hrana păsărilor.....	46
I.4.1. Turmericul (<i>Curcuma longa</i>) – structură chimică, proprietăți	46
I.4.1.1. Rolul antiinflamator	48
I.4.1.2. Rolul coccidiostatic al turmericului	49
I.4.1.3. Efectele antivirale.....	50
I.4.1.4. Rolul turmericului în substituirea antibioticelor	51
I.4.2. Inflamația intestinală, integritatea barierei și modificările intestinale în timpul administrării suplimentelor naturale în dieta păsărilor.....	52
I.4.3. Spirulina platensis – structură chimică, proprietăți	53
Partea II. CERCETĂRI PROPRII	57
II.1. PROIECTAREA PROTOCOLULUI EXPERIMENTAL PENTRU REALIZAREA TEMEI PROPUSE	58
II.1.1. Scopul, obiectivele și structura cercetărilor	58
II.1.2. Supravegherea clinică, evaluarea greutatei corporale și raportul de conversie al hranei	61

II.1.3. Recoltarea și prelucrarea probelor pentru examen histologic și imunohistochimie	61
II.2. EVALUAREA HISTOLOGICĂ, IHC ȘI A RATEI DE CONVERSIE A FURAJELOR DUPĂ EXPUNEREA PUILOR BROILER LA TURMERIC.....	64
II.2.1. Efectul turmericului asupra mucoasei intestinale la puii broiler.....	65
II.3. Expresia imunohistochimică a markerilor IL-6, TNFAP18 și PAX 7 la nivelul intestinului la puii broiler expuși la turmeric.....	73
II.3.1. Expresia Nrf2 și P65 la păsări expuse la turmeric	77
II.4. Cercetări privind reactivitatea țesutului limfoid asociat mucoasei intestinului la turmeric.....	82
II.4.1. Efectele de stimulare a creșterii în greutate ale turmericului.....	86
II.4.2. Impactul suplimentării cu turmenic asupra greutatei corporale și a consumului de furaje	91
II.4.3. Concluzii parțiale.....	98
II.5. EVALUAREA HISTOLOGICĂ, IMUNOHISTOCHIMICĂ ȘI A RATEI DE CONVERSIE A FURAJELOR DUPĂ EXPUNEREA GĂINILOR OUĂTOARE LA ZOOBIOR2 PE BAZĂ DE SPIRULINA PLATENSIS	99
II.5.1. Material și metode	100
II.5.2. Efectul suplimentării cu ZooBioR2 la nivelul mucoasei intestinale.....	101
II.5.3. Expresia imunohistochimică a markerilor Nrf2, p65.....	109
II.5.4. Expresia imunohistochimică a markerilor IL-6 și TNFAP18.....	112
II.5.5. Cercetări privind reactivitatea țesutului limfoid asociat mucoasei intestinului după expunerea găinilor ouătoare la ZooBior2	114
II.5.6.Efectele de îmbunătățire a productivității prin adaosul de ZooBior2.....	118
II.5.7. Concluzii parțiale.....	122
II.6. CONCLUZII FINALE.....	124
Bibliografie.....	126
Anexa 1. Lista de figuri	155
Appendix 1. List of figures.....	160
Anexa 2. Listă tabele	165
Appendix 2. List of tables	166

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION (<i>Romanian</i>).....	1
INTRODUCTION	3
SUMMARY (<i>Romanian</i>)	5
SUMMARY	11
Part I. ANATOMICAL AND MORPHOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF THE DIGESTIVE TRACT IN BIRDS	16
I.1 Morphophysiology of the intestinal tract in birds	17
I.1.1. Physiological peculiarities of the gut in birds	19
I.1.2. Functional histology of the cecum in birds	22
I.2. Intestinal epithelial barrier in birds	23
I.2.1. Intestinal permeability	25
I.2.2. Transcellular transport	26
I.2.2. Paracellular transport	28
I.3. Gut-associated lymphoid tissue in birds	31
I.3.1. Mucosal homeostasis and barrier function	35
I.3.2. The gut immune response in birds	39
I.3.3. Protective mechanisms of the intestinal mucosa in birds	45
I.4. Natural antioxidants used as nutritional supplements in poultry feed	46
I.4.1. Turmeric (<i>Curcuma longa</i>) - chemical structure, properties	46
I.4.1.1. Anti-inflammatory role	48
I.4.1.2. Coccidiostatic role of turmeric	49
I.4.1.3. Antiviral effects	50
I.4.1.4. The role of turmeric in replacing antibiotics	51
I.4.2. Intestinal inflammation, barrier integrity and intestinal changes during administration of natural supplements in poultry diets	52
I.4.3. Spirulina platensis - chemical structure, properties	53
Partea II. PERSONAL RESEARCH	57
II.1. DESIGN OF THE EXPERIMENTAL PROTOCOL FOR THE PROPOSED THEME	58
II.1.1. Purpose, objectives and structure of research	58
II.1.2. Clinical surveillance, body weight assessment and feed conversion ratio	61

II.1.3. Collection and processing of samples for histological examination and immunohistochemistry	61
II.2. HISTOLOGICAL, IHC AND FEED CONVERSION RATE ASSESSMENT AFTER EXPOSURE OF BROILER CHICKENS TO TURMERIC	64
II.2.1. Effect of turmeric on intestinal mucosa in broiler chickens	65
II.3. Immunohistochemical expression of IL-6, TNFAPI8 and PAX 7 markers in the intestine of broiler chickens exposed to turmeric	73
II.3.1. Nrf2 and P65 expression in birds exposed to turmeric	77
II.4. Research on the reactivity of gut mucosa-associated lymphoid tissue to turmeric	82
II.4.1. Weight gain stimulating effects of turmeric	86
II.4.2. Impact of turmeric supplementation on body weight and feed intake	91
II.4.3. Partial conclusions	98
II.5. HISTOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND FEED CONVERSION RATE EVALUATION AFTER EXPOSURE OF LAYING HENS TO SPIRULINA PLATENSIS-BASED ZOOBIOR2	99
II.5.1. Material and methods.....	100
II.5.2. Effect of ZooBioR2 supplementation on intestinal mucosa	101
II.5.3. Immunohistochemical expression of Nrf2, p65 markers	109
II.5.4. Immunohistochemical expression of IL-6 and TNFAPI8 markers.....	112
II.5.5. Research on the reactivity of gut mucosa-associated lymphoid tissue after exposure of laying hens to ZooBior2	114
II.5.6. Productivity enhancing effects of adding ZooBior2.....	118
II.5.7. Partial conclusions	122
II.6. FINAL CONCLUSIONS	124
Bibliography	127
Appendix 1. List of figures (<i>Romanian</i>).....	156
Appendix 1. List of figures.....	161
Appendix 2. List of table (<i>Romanian</i>)	165
Appendix 2. List of tables	166

INTRODUCERE

Cererea tot mai mare de resurse alternative de hrană pentru păsări este determinată de factori precum intensificarea concurenței cu alte sectoare agricole pentru terenuri, impactul schimbărilor climatice și nevoia continuă de a îmbunătăți productivitatea și calitatea cărnii. În plus, s-a pus din ce în ce mai mult accentul pe producerea de alimente funcționale inovatoare, numite nutraceutice, care utilizează surse ecologice (Bonos et al, 2016).

Nutraceuticele se referă la nutrienții esențiali sau la componentele dietetice derivate de la animale care dețin o valoare nutrițională și farmaceutică semnificativă. Acestea prezintă proprietăți imunomodulatoare și joacă un rol crucial în prevenirea bolilor, promovarea sănătății generale și, ulterior, în creșterea productivității (Dhama et al, 2015, Aronson et al, 2017, Helal et al, 2019, Waheed et al, 2020). În plus, aceste produse nutraceutice ajută la protejarea gazdei împotriva bolilor infecțioase (Cencic et al, 2010), precum și la susținerea funcțiilor fiziologice esențiale care contribuie la bunăstarea gazdei (Das et al, 2012). Activitatea antioxidantă a nutraceuticelor oferă o mare speranță ca soluție împotriva radicalilor liberi de oxigen la păsări și mamifere, prin creșterea activității mitocondriale Mn-SOD și a expresiei genice a tioredoxinei-2 și peroxiredoxinei-3 (Zhou et al., 2015). Dintre nutraceutice am evaluat efectul turmericului și produsului pe bază de *Spirulina platensis*, ZooBior2.

Curcumina (diferuloilmetan), un polifenol natural, este principiul activ al turmericului (*Curcuma longa*). Curcuma (*Curcuma longa*) conține o componentă activă numită curcumină (WuthiUdomler et al., 2000 și Mashhadani, 2015) ce variază între 2 și 5% în turmeric. Datorită proprietăților medicinale ale turmericului, utilizarea acestuia în hrana păsărilor a devenit extinsă în ultimul deceniu. Turmericul poate restabili performanța de creștere afectată de stresul termic, posibil datorită capacității sale de a atenua disfuncția mitocondrială a organismului și de a spori biogeneza mitocondrială cauzată de stresul oxidativ. Aceasta prezintă numeroase roluri dintre care amintim coccidiostatic, antioxidant, antibiotic natural și antiviral. Suplimentarea de turmeric în furajul pasărilor nu produce niciun efect dăunător asupra acestora și nici asupra consumatorilor, în cele din urmă, conducând chiar la o mai bună rentabilitate pentru agricultori.

Alga verde-albastră (*Spirulina platensis*) este întâlnită în întreaga lume cu o valoare sa nutritivă bine documentată. Aceasta conține o proporție ridicată de proteine (50-70% în greutate uscată) fiind considerată o sursă bună de aminoacizi esențiali, aspect confirmat de Farag M. R. și colab. Hrana cu spirulină poate crește populația de *Lactobacillus*. De asemenea poate îmbunătăți gradul de absorbție a vitaminelor din dietă, aspecte importante mai ales că rolul primar al hranei este nu doar de a asigura

suficienți nutrienți pentru efectuarea tuturor cerințelor metabolice ale organismului, ci și de a modula diversele funcții ale acestuia. Conținutul mai mare de carotenoizi din Spirulina ajută la suplimentarea vitaminei A iar astfel se îmbunătățește imunitatea printr-o activitate antioxidantă mai bună. Numeroasele beneficii ce rezultă din suplimentarea dietei puilor cu aceasta se exprimă printr-un consum al hranei mai eficient și o greutate corporală mai ridicată.

Datele experimentale publicate în literatura de specialitate demonstrează ca adaosul de aditivi fitogenici precum pulberea de turmeric sau spirulină în hrana păsărilor este accesibil din punct de vedere economic întrucât sănătatea păsărilor este îmbunătățită, la fel și greutatea corporală printr-un consum mai redus de hrană.

Scopul primordial al acestei teze de doctorat a fost de a evalua efectul turmericului asupra mucoasei intestinale și țesutului limfoid asociat acesteia la puii broiler crescuți în sistem gospodăresc și efectul produsului ZooBior supra acelorași structuri la găinile ouătoare.

Efectele turmericului și ale produsului ZooBior s-au regăsit și asupra creșterii în greutate și a ratei de convesie a furajelor.

O parte din rezultatele de cercetare au fost valorificate și publicate în reviste de specialitate în domeniul medicinei veterinare.

Cercetările care au stat la baza elaborării acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibile fără sprijinul conducerii Universității și Facultății de Medicină Veterinară din Iași, personalului didactic din cadrul Departamentului de Preclinici.

În mod special, omagiul și recunoștiința mea profundă se îndreaptă către doamna Profesor univ. Carmen Solcan, mentorul meu, căruia îi adresez calde mulțumiri pentru motivația și sprijinul acordat la elaborarea acestei lucrări prin sfaturile științifice prețioase, răbdare, generozitate, încurajare și îndrumarea pedagogică pertinentă fără de care această teză de doctorat nu ar fi existat.

Doresc să mulțumesc, cu deosebit respect, cadrelor didactice care au făcut parte din comisia de îndrumare, domnului Conferențiar Dr. Sorin I. Beșchea-Chiriac, domnului Conf. Dr. Constantin Spătaru și doamnei Conf. Dr. Hrițcu Luminița Diana. Alese mulțumiri distinșilor referenți oficiali ai Comisiei de doctorat care m-au onorat prin acceptul lor de a face parte din colectivul de analiză a tezei și pentru aprecierile referitoare la conținutul acesteia

Cu adâncă recunoștiință mulțumesc apropiaților mei care au crezut în mine și m-au sprijinit permanent pe toată perioada studiilor doctorale.

INTRODUCTION

The growing demand for alternative feed resources for poultry is driven by factors such as increasing competition with other agricultural sectors for land, the impact of climate change and the continuing need to improve productivity and meat quality. In addition, there has been an increasing focus on the production of innovative functional foods, called nutraceuticals, using environmentally friendly sources (Bonos et al, 2016).

Nutraceuticals refer to essential nutrients or dietary components derived from animals that have significant nutritional and pharmaceutical value. They exhibit immunomodulatory properties and play a crucial role in preventing disease, promoting general health and subsequently increasing productivity (Dhama et al, 2015, Aronson et al, 2017, Helal et al, 2019, Waheed et al, 2020). In addition, these nutraceuticals help to protect the host against infectious diseases (Cencic et al, 2010) as well as support essential physiological functions that contribute to host welfare (Das et al, 2012). The antioxidant activity of nutraceuticals offers great promise as a solution against oxygen free radicals in birds and mammals by increasing mitochondrial Mn-SOD activity and gene expression of thioredoxin-2 and peroxiredoxin-3 (Zhou et al, 2015). Among nutraceuticals we evaluated the effect of turmeric and the *Spirulina platensis*-based product, ZooBior2.

Curcumin (diferuloylmethane), a natural polyphenol, is the active ingredient of turmeric (*Curcuma longa*). It has been a popular spice in Asian and Middle Eastern cuisines for centuries (Rajput et al, 2013). Turmeric (*Curcuma longa*) contains an active component called curcumin (WuthiUdomler et al., 2000 and Mashhadani, 2015) which ranges from 2 to 5% in turmeric. Due to the medicinal properties of turmeric, its use in poultry feed has become extensive in the last decade. Curcumin can restore growth performance impaired by heat stress, possibly due to its ability to alleviate mitochondrial dysfunction of the organism and enhance mitochondrial biogenesis caused by oxidative stress. It has numerous roles including coccidiostat, antioxidant, natural antibiotic and antiviral. The supplementation of turmeric in poultry feed has no harmful effect on poultry or consumers, ultimately leading to better profitability for farmers.

Blue-green algae (*Spirulina platensis*) is found all over the world with its well-documented nutritional value. It contains a high proportion of protein (50-70% by dry weight) and is considered a good source of essential amino acids, a point confirmed by Farag M. R. et al.

Feeding spirulina can increase the *Lactobacillus* population. It can also improve the absorption of vitamins from the diet, which is important because the primary role of food is not only to provide sufficient nutrients to carry out all of the body's metabolic requirements, but also to modulate the body's various functions. Spirulina's higher carotenoid content helps to supplement vitamin A and thus improves immunity through better antioxidant activity. The many benefits of supplementing the diet of chickens with it are expressed in more efficient feed intake and higher body weight.

Experimental data published in the literature demonstrate that the addition of phytogenic additives such as turmeric powder or spirulina to poultry feed is economically feasible as the health of the birds is improved, as is their body weight through reduced feed consumption.

The primary aim of this PhD thesis was to evaluate the effect of turmeric on intestinal mucosa and associated lymphoid tissue in broiler chickens reared in a free-range system and the effect of ZooBior on the same structures in laying hens.

The effects of turmeric and ZooBior were also found on weight gain and feed conversion rate.

Some of the research results have been used and published in peer-reviewed journals.

The research that was the basis for the elaboration of this PhD thesis would not have been possible without the support of the management of the University and the Faculty of Veterinary Medicine of Iasi, the teaching staff of the Department of Preclinics.

In particular, my deepest homage and gratitude goes to Prof. Univ. Carmen Solcan, my mentor, to whom I address my warm thanks for her motivation and support in the elaboration of this work through her precious scientific advice, patience, generosity, encouragement and pertinent pedagogical guidance without which this PhD thesis would not have existed.

Dr. Constantin Spătaru and Conf. Dr. Hrițcu Luminița Diana.

My warm thanks to the distinguished official referees of the PhD Commission who honoured me by accepting to be part of the thesis analysis group and for their appreciation of its content.

With deep gratitude I thank my close friends who believed in me and supported me continuously throughout my doctoral studies.

REZUMAT

Odată cu interzicerea antibioticelor în anul 2006 la nivelul Uniunii Europene, se caută alternative pentru îmbunătățirea sănătății animalelor. Unele din cele mai indicate, conform studiilor, sunt aditivii fitogenici adăugați în dieta păsărilor. Inflamația intestinală la pui afectează funcția, integritatea intestinului și performanțele de creștere. Strategiile dietetice de inhibare ale procesului inflamator intestinal sunt principalele ținte în acest sens.

Există numeroase studii pe animale care au arătat că polifenolii din alimentație, în special reprezentanții grupului flavonoidelor, sunt capabili să atenueze inflamația prin modularea activității NF- κ B și Nrf2. Cu toate acestea, potențialele efecte antiinflamatorii ale acestora au fost investigate relativ puțin până în prezent la puii broiler.

Trebuie menționat faptul că țesutul limfoid asociat mucoasei digestive (TLAMD) reprezintă o primă linie de apărare împotriva antigenilor dăunători care pătrund în organism în timpul hrănirii și în funcție de localizare, este prezent sub formă de agregate de celule limfoide și, de asemenea, sub formă de celule organizate în foliculi limfoizi și amigdale (Casteleyn et al, 2010). Țesuturile limfoide asociate mucoaselor sunt foarte dezvoltate la pui, în numeroase locații și în special în tractul gastrointestinal și includ structuri unice la păsări, precum diverticulul lui Meckel și amigdalele cecale. Sistemul TLAMD are ca trăsătură caracteristică producerea de anticorpi IgA și cuprinde peste 2/3 din toate celulele limfoide ale întregului sistem imunitar. Aproximativ 80% din toate imunoglobulinele și 50% din limfocite sunt produse în intestin. Țesutul limfoid este compus dintr-un spațiu interfolicular în care se acumulează celulele T, iar celulele B formează limfonodululi; toate acestea sunt acoperite de epiteliu specializat asociat foliculilor (FAE). Se poate afirma că sistemul de apărare fin reglat al barierei intestinale este influențat de o varietate de factori și este rezultatul unei interacțiuni între mucoasă, microbiotă și sistemul imunitar intestinal (Hoffmann et al, 2009). De asemenea, epiteliul intestinal este protejat prin intermediul stratului de mucus de microorganismele comensale prezente în mod normal în lumenul intestinal, precum și de bacteriile sau virusuri patogene. Mucusul oferă protecție nu numai printr-o barieră fizică, ci și prin intermediul unor peptide antimicrobiene secretate de epiteliu în stratul de mucus și legate în interiorul acestuia.

Dintre aditivii fitogenici utilizați în dieta păsărilor am evaluat Turmericul (*Curcuma longa*) și produsul ZooBior pe bază de *Spirulina platensis*.

Turmericul conține o componentă activă numită curcumină (WuthiUdomler et al., 2000 și Mashhadani, 2015) ce variază între 2 și 5%. Turmericul (rădăcina curcumei) este utilizat în mod obișnuit ca aditiv pentru hrana animalelor, deoarece are activitate de ameliorare a inflamației intestinale, este puternic antiviral, antibacterian, antifungic și

este utilizat cu succes în producția intensivă de creștere a păsărilor și nu numai (Choudhury et al, 2019).

Alga verde-albastră (*Spirulina platensis*), conține o proporție ridicată de proteine (50-70% în greutate uscată) fiind considerată o sursă bună de aminoacizi esențiali, aspect confirmat de Farag M. R. și colab. Ross și Dominy (1990) au analizat compoziția algei *Spirulina platensis* și au găsit valori similare de proteină brută (60,5%) și fosfor (0,95%), o cantitate de substanță uscată (94,5%). Produsul ZooBior pe baza de *Spirulina* îmbunătățește sănătatea păsărilor și a mamiferelor și crește și mai mult eficiența producției prin modularea microbiotei și îmbunătățirea funcției țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale.

Cercetarea clinică a avut loc în sistem gospodăresc iar studiul histologic, imunohistochimic și histomorfometric a fost efectuat în cadrul Facultății de Medicină Veterinară a Universității pentru Științele Vieții "Ion Ionescu de la Brad" din Iași, în Laboratorul de Histologie și Embriologie Victoria Zinca al Facultății de Medicină Veterinară. Cercetările cuprind două etape: studiu clinic efectuat în sistem gospodăresc și evaluarea histologică, imunohistochimică și histomorfometrică a intestinului. Puii broileri au fost expusi la pulbere de turmeric și găinile ouătoare tinere luate în studiu la suplimentul nutrițional – ZooBioR2 (ZBR2).

Administrarea turmericului, s-a realizat la o zi după eclozare, timp de 42 de zile, la pui broiler. Pulberea de turmeric (marca: HerbalSana; țara de origine: India) utilizată în experiment a avut următoarea valoare nutritivă, conform mențiunii de pe etichetă: grăsimi totale - 9,7 g, din care 1,8 g acizi grași saturați; carbohidrați - 44,4 g, din care zaharuri 3,2 g; fibre alimentare - 22,7 g; proteine - 9,7 g; sare - 0,07 g / 100 g pulbere de turmeric. Din pulberea de turmeric s-au determinat curcumina și conținutul total de fenoli. Conținutul de curcumină a fost de $1,13 \pm 0,06$ g / 100 g pulbere de turmeric, determinat spectrophotometric conform literaturii (Chauhan et al, 1999). Conținutul total de fenoli determinat a fost de $2,703 \pm 0,110$ g de echivalenți de acid galic (GAE) / 100 g de pulbere de turmeric, așa cum a fost determinat conform unei metode descrise anterior (Luca et al, 2022).

Păsările din grupul de control (C) au fost hrănite cu o dietă comercială pe bază de porumb și soia: starter (1-14 zile), de creștere (15- 28 zile), de finisare (29 - 42 zile), în conformitate cu orientările NRC (1994). Păsările au primit suplimentar pulbere de turmeric/kg furaj astfel: 5 g /kg (LE1), 10 g /kg (E2). 20 g /kg (E3).

Prin adaosul de turmeric în dieta puilor, a crescut înălțimea vilozităților duodenale la LE2 iar ea mai mică valoare la lotul control. Dintre loturile experimentale cea mai mică valoare a înălțimii vilozităților s-a observat la LE3.

Valorile adâncimii criptelor cele mai mari le identificăm la LE3 (2% turmeric). Cele mai mici valori sunt la LE2 (1% turmeric). LE1 (0,5%) are valori apropiate de

cele ale lotului martor. Cel mai bun raport înălțime vilozitate: adâncime criptă se observă la LE2. Cel mai slab raport dintre toate loturile se observă la LE3. Diametrul vilozităților la baza acestora cel mai mare se remarcă la LE3 iar cel mai mic diametru la LE1.

Integritatea epiteliului intestinal, a fost conservată foarte bine la puii din LE1 și mai redusă la celelalte loturi, cea mai redusă fiind la lotul control. Infiltrațiile limfoide difuze asociate cu desprinderea epiteliului intestinal au fost mai intense la lotul control și LE3 și reduse la LE1 și LE2.

Din punct de vedere al reactivității inflamatorii, în acest experiment, s-a observat o expresie pozitivă pentru IL-6 în grupurile de control și LE3, sugerând existența unui proces inflamator și foarte redusă la LE1 și LE2. Pulberea de turmeric a redus inflamația la nivelul intestinului puilor din LE1 și LE2. Expresia TNFAP18 este mai intensă în grupurile de control, moderată în LE3 și redusă la LE1 și LE2. Expresia TNFAP18 se corelează cu IL-6 și atestă prezența unui proces inflamator la lotul control care este atenuat la celelalte loturi cel mai redus fiind la LE2. Expresia Pax-7 este pozitivă la toate loturile. A fost evaluată și expresia genei p65 care prezintă o expresie similară cu IL6 și TNFAP18, atestând astfel procesul inflamator care se reduce prin suplimentarea cu turmeric.

Suplimentarea cu doze mici și medii de turmeric duce la creșterea expresiei expresiei Nrf2, un marker care este activat de aceste suplimente. Nrf2 ajunge în nucleu și determină transcripția genelor cu rol antioxidant superoxid dismutaza și catalaza reducând astfel stresul oxidativ din timpul inflamației. Adăugarea de 1% turmeric în dieta puilor broiler din LE2 a dus la superexpresia Nrf2. Adăugarea de 1% și 2% turmeric în dieta puilor din LE2 respectiv LE3 a dus la scăderea accentuată a expresiei p65 la nivel cecal. Adăugarea în dieta păsărilor din lotul E2 de 1% turmeric duce la reducerea cea mai semnificativă a expresiei p65 și creșterea cea mai accentuată a expresiei Nrf2 în cecum. Există o legătură în cadrul proceselor de oxido reducere între creșterea expresiei Nrf2 și scăderea expresiei p65 la nivel intestinal.

Țesutul limfoid de la nivelul amigdalelor cecale prezintă aglomerări limfoepiteliale mari, formate predominant din limfocite T la lotul martor. La celelalte loturi apar și limfonoduli în care are loc diferențierea limfocitelor B în plasmocite secretoare de IgA. Numărul acestora este variabil, oarecum apropiat numeric de dimensiuni moderate. Remarcăm prezența berierei epiteliale integre la LE2 și ușor distrusă în funcție de lot. La lotul control a fost semnalat edemul și desprinderea epiteliului columnar absorbtiv.

Ținând cont de particularitățile morfologice, reactivitatea țesutului limfoid, indicii de conversie al hranei scăzut, de consumul hranei în cea mai redusă cantitate și de greutatea puilor, concluzionăm că la sfârșitul perioadei de creștere adaosul de 1%

turmeric în dietă a dus la cele mai bune rezultate, iar în primele 14 zile de viață adaosul de 0,5% turmeric în hrană a dus la rezultate semnificativ mai bune.

În ceea ce privește consumul de furaje, cea mai scăzută cantitate consumată s-a obținut prin adaosul de 0,5% turmeric în dieta puilor în prima perioadă de creștere cu valori de 110g în primele 7 zile, 390g între 7 și 14 zile și 900g până în ziua 21. Între ziua 22 și 42 cea mai scăzută cantitate de hrană consumată s-a obținut la LE2 cu valori de 1400g până în ziua 29 iar până în ziua 42, 2000g. Cel mai mic indice de conversie al hranei s-a observat la LE2 prin adaosul de turmeric în proporție de 1% în dieta puilor.

Greutatea puilor cea mai bună se observă la LE1 (0,5% turmeric) dar LE2 (1% turmeric) are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative. Valoarea greutateii puilor din LE1 în ziua 42 a fost de 2989.80 ± 32.30 g. Din punct de vedere economic cel mai avantajos este să se adauge 1% turmeric în dietă pentru creșterea greutateii corporale, întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici dintre loturile experimentale

Adaosul de 2% turmeric în hrană, la finalul perioadei experimentale, are efecte negative asupra indicatorilor mai sus menționați. Ceilalți indicatori au valori similare cu lotul martor, astfel încât nu se justifică din punct de vedere economic adaosul de 2% turmeric.

ZooBior2 este un remediu natural complex care conține compuși biologic activi derivați din cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis* (SP). Acesta conține: aminoacizi, inclusiv cei imunoactivi liberi și ca părți componente ale peptidelor, respectiv proteinelor; polizaharide; polizaharide sulfatate; fosfolipide și oligoelemente zinc și seleniu (Rotaru, 2016, Rudic et al, 2004).

Cercetările au fost efectuate timp de 60 de zile, pe 70 de găini ouătoare de 23 de săptămâni din hibridul Braun-Nic, împărțite în 5 loturi, fiecare cu câte 14 păsări. Dietele constau în 5 mg/kg furaj (LE1); 10 mg/kg furaj (LE2); 15 mg/kg furaj (LE3); 20 mg/kg furaj Zoobior (LE4).

Parametrii morfometrici ce caracterizează arhitectura mucoasei au variat între lotul martor și cele experimentale la care s-a adăugat ZooBior2. S-au constatat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește lungimea vilozităților și adâncimea criptelor la duoden, jejun, ileon și cecum între loturile experimentale și lotul martor. Înălțimea cea mai mare a vilozităților intestinale se observă la LE1 indiferent de segmentul studiat iar valorile cele mai mici ale înălțimii vilozităților au putut fi identificate la LE4, prin adaosul celei mai mari concentrații de ZooBior2. Grosimea musculoasei are valorile cele mai mici la LE4 iar cele mai mari valori la LE1. Grosimea stratului muscular al duodenului și al cecumului a fost semnificativ mai mică la loturile experimentale comparativ cu lotul martor (LM), fiind, de asemenea, implicată într-o digestibilitate mai bună a furajelor.

Diametrul vilozităților la baza acestora cel mai mare se remarcă la LE1 iar cel mai mic diametru la LE4. Valorile sunt semnificativ mai mici la loturile experimentale decât la LM. În studiul nostru ZooBior2 nu a avut un efect semnificativ asupra înălțimii vilozităților și adâncimii criptelor duodenale. Includerea în rație a compusului ZooBior2 a determinat o ușoară scădere a înălțimii vilozităților intestinale și a adâncimii criptelor în toate segmentele intestinale. O scădere a adâncimii criptelor este un indicator a unei rate mai mari de reînnoire a țesutului epitelial și ar putea fi implicată într-o mai bună digestibilitate a furajelor. Expresia Il-6, TNF α și p65 a fost mai intensă la LM și mai redusă de la LE4, LE3, LE2 la LE1. Fiind markeri ai inflamației s-a constatat prezența inflamației la lotul martor care scade progresiv fiind redusă la LE1, ceea ce denotă rolul antiinflamator al produsului ZooBior2. Expresia Nrf2 a fost foarte intensă la LE1 și s-a redus progresiv de la LE2, LE3, LE4 la lotul martor. Aceasta diferențiere a expresiei Nrf2 explică efectul antioxidant, respectiv antiinflamator al produsului ZooBior2.

Aglomerările limfoepiteliale, cu reducerea integrității barierei epiteliale, edem, s-a constatat la lotul control și LE4. La toate loturile experimentale în aceste aglomerări se evidențiază și limfonoduli în număr și dimensiuni variabile. La LE1 s-au remarcat limfonoduli mici, la celelalte loturi LE2, LE3 și LE4 au avut dimensiuni variabile, ceva mai mari decât la LE1. Considerăm că prezența acestor limfonoduli este legată de producerea plasmocitelor secretoare de IgA prezenta în intestin care marestă răspunsul imun local,

Greutatea găinilor ouătoare cea mai bună s-a constatat la LE1; LE2 are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative statistic. Adaosul în dietă a compusului ZooBior2 a îmbunătățit indicii de conversie al hranei și greutatea acestora. Aminoacizii esențiali abundenți care se găsesc în acest compus joacă un rol crucial în îmbunătățirea stării generale de sănătate și a greutății corporale, atenuând în același timp tulburările de sănătate și atenuând efectele stresului oxidativ.

Constatările contradictorii dintre studii cu privire la efectele suplimentării ZooBior2 în dietele pentru păsări pot fi atribuite diversilor factori: doza de ZooBior2, pregătirea furajelor, vârsta puilor, hibridii, condițiile de cazare. Spirulina are un impact benefic și asupra florei gastro-intestinale, promovând un echilibru mai sănătos al microorganismelor și, de asemenea, îmbunătățește activitățile enzimelor digestive, ceea ce duce la o digestie generală îmbunătățită a materiei uscate și a azotului (Park et al, 2018).

Din punct de vedere clinic și economic se recomandă o doză mai mică de ZooBior2 în dietă pentru creșterea greutății corporale întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici la loturile experimentale. Doza mai mare de ZooBior2 a determinat o reducere semnificativă a înălțimii vilozităților, a raportului înălțime vilozitate: adâncime criptă și a greutății păsărilor.

Proprietățile antiinflamatorii ale spirulinei pot fi atribuite capacității sale de a inhiba sinteza citokinelor proinflamatorii, cum ar fi TNF α , IL-6 și p65, precum și creșterea activității Nrf2.

Administrarea compușilor fenolici din turmeric și ZooBior2 au redus inflamația intestinală, au îmbunătățit digestibilitatea nutrienților și metabolismul puilor respectiv a păsărilor.

SUMMARY

With the 2006 EU ban on antibiotics, alternatives are being sought to improve animal health. Some of the most suitable, according to studies, are phytogetic additives added to poultry diets. Intestinal inflammation in chickens affects function, gut integrity and growth performance. Dietary strategies to inhibit the intestinal inflammatory process are the main targets in this regard.

There are numerous animal studies that have shown that dietary polyphenols, especially representatives of the flavonoid group, are able to attenuate inflammation by modulating NF- κ B and Nrf2 activity. However, their potential anti-inflammatory effects have been investigated relatively little to date in broiler chickens.

It should be noted that digestive mucosa-associated lymphoid tissue (DLAMT) is a first line of defence against harmful antigens that enter the body during feeding and depending on location, is present as aggregates of lymphoid cells and also as cells organised into lymphoid follicles and tonsils (Casteleyn et al, 2010). Mucosa-associated lymphoid tissues are highly developed in chickens in numerous locations and especially in the gastrointestinal tract and include structures unique to birds, such as Meckel's diverticulum and cecal tonsils. The TLAMD system is characterised by the production of IgA antibodies and comprises more than 2/3 of all lymphoid cells of the entire immune system. Approximately 80% of all immunoglobulins and 50% of lymphocytes are produced in the gut. Lymphoid tissue is composed of an interfollicular space in which T-cells accumulate and B-cells form lymphoid cells; all of which are covered by specialized follicle-associated epithelium (FAE). It can be argued that the finely tuned defence system of the intestinal barrier is influenced by a variety of factors and is the result of an interaction between mucosa, microbiota and the intestinal immune system (Hoffmann et al, 2009). The intestinal epithelium is also protected via the mucus layer from commensal microorganisms normally present in the intestinal lumen, as well as from pathogenic bacteria or viruses. The mucus provides protection not only through a physical barrier, but also through antimicrobial peptides secreted by the epithelium into the mucus layer and bound within it.

Among the phytogetic additives used in poultry diets we evaluated Turmeric (*Curcuma longa*) and the *Spirulina platensis*-based product ZooBior .

Turmeric contains an active component called curcumin (WuthiUdomler et al., 2000 and Mashhadani, 2015) ranging from 2 to 5%. Turmeric (turmeric root) is commonly used as a feed additive as it has gut inflammation relieving activity, is potent antiviral, antibacterial, antifungal and is successfully used in intensive poultry production and beyond (Choudhury et al, 2019).

Blue-green algae (*Spirulina platensis*), contains a high proportion of protein (50-70% in dry weight) being considered a good source of essential amino acids, a point confirmed by Farag M. R. et al. Ross and Dominy (1990) analysed the composition of *Spirulina*

platensis algae and found similar values of crude protein (60.5%) and phosphorus (0.95%), a similar amount of dry matter (94.5%). The Spirulina-based ZooBior product improves the health of birds and mammals and further increases production efficiency by modulating the microbiota and improving the function of lymphoid tissue associated with the intestinal mucosa.

The clinical research was carried out in a household system and the histological, immunohistochemical and histomorphometric study was performed in the Faculty of Veterinary Medicine of the "Ion Ionescu de la Brad" University for Life Sciences in Iasi, in the Victoria Zinca Histology and Embryology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine. The research consists of two stages: clinical study carried out in a household system and histological, immunohistochemical and histomorphometric evaluation of the intestine. Broiler chicks were exposed to turmeric powder and young laying hens taken in the study to the nutritional supplement - ZooBioR2 (ZBR2).

Administration of turmeric, was carried out one day after hatching for 42 days in broiler chicks. The turmeric powder (brand: HerbalSana; country of origin: India) used in the experiment had the following nutritional value according to the label: total fat - 9.7 g, of which 1.8 g saturated fatty acids; carbohydrates - 44.4 g, of which 3.2 g sugars; dietary fibre - 22.7 g; protein - 9.7 g; salt - 0.07 g/100 g turmeric powder. Curcumin and total phenol content were determined from the turmeric powder. The curcumin content was 1.13 ± 0.06 g / 100 g turmeric powder, determined spectrophotometrically according to literature (Chauhan et al, 1999). The total phenol content determined was 2.703 ± 0.110 g gallic acid equivalents (GAE) / 100 g turmeric powder, as determined according to a previously described method (Luca et al, 2022). Birds in the control group (C) were fed a commercial corn-soybean diet: starter (1-14 days), rearing (15- 28 days), finishing (29 - 42 days) according to NRC (1994) guidelines. The birds received additional turmeric powder/kg feed as follows: 5 g/kg (LE1), 10 g/kg (LE2). 20 g/kg (LE3). The addition of turmeric to the diet of chickens increased the height of duodenal villi in LE2 and decreased it in the control group. Among the experimental flocks, the lowest value of villi height was observed in LE3. The highest crypt depth values were found in LE3 (2% turmeric). The lowest values are at LE2 (1% turmeric). LE1 (0.5%) has values close to those of the control batch. The best ratio of height of villousness: crypt depth is observed in LE2. The poorest ratio of all plots is observed in LE3. The diameter of the villi at their base is the largest in LE3 and the smallest in E1.

Integrity of the intestinal epithelium, was very well preserved in LE1 chicks and lower in the other flocks, the lowest being in the control flock. Diffuse lymphoid infiltrates associated with intestinal epithelial detachment were more intense in the control and E3 groups and reduced in LE1 and LE2.

In terms of inflammatory reactivity, in this experiment, a positive expression for IL-6 was observed in the control and LE3 groups, suggesting the existence of an inflammatory process and very reduced in LE1 and LE2. Turmeric powder reduced

inflammation in the gut of LE1 and LE2 chicks. TNF alpha expression is more intense in control groups, moderate in LE3 and reduced in LE1 and LE2. TNFalpha expression correlates with IL-6 and shows the presence of an inflammatory process in the control group which is attenuated in the other groups, the lowest being in LE2. Pax-7 expression is positive in all groups. Expression of the p65 gene was also assessed and shows similar expression to IL6 and TNF alpha, thus attesting to the inflammatory process that is reduced by turmeric supplementation.

Supplementation with low and medium doses of turmeric leads to increased expression of Nrf2, a marker that is activated by these supplements. Nrf2 reaches the nucleus and causes transcription of the antioxidant genes superoxide dismutase and catalase thereby reducing oxidative stress during inflammation. Addition of 1% turmeric to the diet of LE2 broiler chicks resulted in overexpression of Nrf2. Addition of 1% and 2% turmeric to the diet of LE2 and LE3 broiler chickens respectively resulted in a marked decrease in p65 expression at the cecal level. Addition of 1% turmeric to the diet of birds from E2 leads to the most significant reduction of p65 expression and the most pronounced increase of Nrf2 expression in the cecum. There is a link in oxido-reduction processes between increased Nrf2 expression and decreased p65 expression in the gut.

The lymphoid tissue of the cecal tonsils shows large lymphoepithelial agglomerations, predominantly formed by T lymphocytes in the control group. In the other batches, lymphnodes also appear in which differentiation of B lymphocytes into IgA-secreting plasma cells occurs. Their number is variable, somewhat close to moderate size numerically. We note the presence of epithelial berry intact in LE2 and slightly destroyed depending on the batch. In the control batch edema and detachment of the columnar absorptive epithelium was reported.

Taking into account morphological peculiarities, lymphoid tissue reactivity, low feed conversion index, feed consumption in the lowest amount and weight of the chicks, we conclude that at the end of the rearing period the addition of 1% turmeric in the diet led to the best results and in the first 14 days of life the addition of 0.5% turmeric in the feed led to significantly better results.

In terms of feed consumption, the lowest amount consumed was obtained by adding 0.5% turmeric to the diet of the chicks in the first growing period with values of 110g in the first 7 days, 390g between 7 and 14 days and 900g by day 21. Between day 22 and 42 the lowest amount of feed consumed was obtained in LE2 with values of 1400g until day 29 and 2000g until day 42. The lowest feed conversion ratio was observed in LE2 by adding 1% turmeric to the diet of the chicks.

The best chick weights were observed in LE1 (0.5% turmeric) but LE2 (1% turmeric) had very similar values and the differences were not significant. The weight value of LE1 chicks on day 42 was 2989.80 ± 32.30 g. Economically it is most advantageous to add 1% turmeric to the diet for body weight gain, as feed conversion ratio values and feed consumption are the lowest among the experimental groups

The addition of 2% turmeric in the feed at the end of the experimental period has negative effects on the above mentioned indicators. The other indicators have similar values to the control group, so the addition of 2% turmeric is not economically justified.

ZooBior2 is a complex natural remedy containing biologically active compounds derived from the cyanobacterium *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (SP). It contains: amino acids, including free immunoreactive ones and as component parts of peptides and proteins respectively; polysaccharides; sulphated polysaccharides; phospholipids and trace elements zinc and selenium (Rotaru, 2016, Rudic et al, 2004). The research was conducted for 60 days on 70 23-week-old laying hens of the Braun-Nic hybrid, divided into 5 flocks, each with 14 birds. The diets consisted of 5 mg/kg feed (LE1); 10 mg/kg feed (LE2); 15 mg/kg feed (LE3); 20 mg/kg Zoobior feed (LE4). Morphometric parameters characterizing mucosal architecture varied between the control and experimental groups to which ZooBior2 was added. Statistically significant differences were found in the length of the villi and the depth of the crypts in the duodenum, jejunum, ileum and cecum between the experimental and control groups. The highest height of intestinal villi was observed in LE1 irrespective of the segment studied and the lowest values of villi height could be identified in LE4 by adding the highest concentration of ZooBior2. Muscle thickness had the lowest values in LE4 and the highest values in LE1. The thickness of the muscle layer of the duodenum and caecum was significantly lower in the experimental groups compared to the control group (LM), being also involved in a better digestibility of the feed.

The diameter of the villi at the base of the villi was highest in LE1 and lowest in LE4. The values were significantly lower in the experimental groups than in LM. In our study ZooBior2 had no significant effect on the height of the villi and the depth of the duodenal crypts. Inclusion of ZooBior2 compound in the ration resulted in a slight decrease in intestinal villus height and crypt depth in all intestinal segments. A decrease in crypt depth is an indicator of a higher rate of epithelial tissue turnover and could be implicated in better feed digestibility. Statistically significant differences were found in the length of the villi and the depth of the crypts in the duodenum, jejunum, ileum and cecum between the experimental and control groups. The highest height of intestinal villi was observed in LE1 irrespective of the segment studied and the lowest values of villi height could be identified in LE4 by adding the highest concentration of ZooBior2. Muscle thickness had the lowest values in LE4 and the highest values in LE1. The thickness of the muscle layer of the duodenum and caecum was significantly lower in the experimental groups compared to the control group (LM), being also involved in a better digestibility of the feed.

The diameter of the villi at the base of the villi was highest in LE1 and lowest in LE4. The values were significantly lower in the experimental groups than in LM. In our study ZooBior2 had no significant effect on the height of the villi and the depth of the duodenal crypts. Inclusion of ZooBior2 compound in the ration resulted in a slight decrease in intestinal villus height and crypt depth in all intestinal segments. A decrease

in crypt depth is an indicator of a higher rate of epithelial tissue turnover and could be implicated in better feed digestibility. Expression of IL-6, TNF alpha and p65 was more intense in LM and lower from LE4, LE3, LE2 to LE1. Being markers of inflammation, the presence of inflammation was found in the control group which progressively decreases being reduced in LE1, indicating the anti-inflammatory role of ZooBior2. Nrf2 expression was very intense in LE1 and progressively reduced from LE2, LE3, LE4 to the control group. This differentiation of Nrf2 expression explains the antioxidant and anti-inflammatory effect of ZooBior2.

Lymphoepithelial agglomerations, with reduced epithelial barrier integrity, oedema, was found in the control and LE4 groups. In all the experimental groups in these agglomerations, lymph nodes in variable number and size were also evident. In LE1 small lymph nodes were observed, in the other groups LE2, LE3 and LE4 they had variable sizes, somewhat larger than in LE1. We believe that the presence of these lymph nodes is related to the production of IgA-secreting plasma cells present in the intestine which enhances the local immune response,

The weight of laying hens was best in LE1; LE2 had very similar values, the differences not being statistically significant. Addition of ZooBior2 compound to the diet improved feed conversion index and weight. The abundant essential amino acids found in this compound play a crucial role in improving overall health and body weight, while alleviating health disorders and mitigating the effects of oxidative stress.

Conflicting findings between studies on the effects of ZooBior2 supplementation in poultry diets can be attributed to various factors: dose of ZooBior2, feed preparation, age of chicks, hybrids, housing conditions. Spirulina also has a beneficial impact on the gastrointestinal flora, promoting a healthier balance of microorganisms, and also enhances digestive enzyme activities, leading to improved overall digestion of dry matter and nitrogen (Park et al, 2018).

Clinically and economically, a lower dose of ZooBior2 in the diet is recommended for body weight gain as feed conversion ratio values and feed consumption are lowest in experimental flocks. The higher dose of ZooBior2 resulted in a significant reduction in the height of the villi, villi height: crypt depth ratio and bird weight. The anti-inflammatory properties of spirulina can be attributed to its ability to inhibit the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL-6 and p65, as well as to increase Nrf2 activity. Administration of phenolic compounds from turmeric and ZooBior2 reduced intestinal inflammation, improved nutrient digestibility and metabolism of chicks and birds respectively.

**PARTEA I. PARTICULARITĂȚI ANATOMICE ȘI
MORFOFIZIOLOGICE ALE TUBULUI DIGESTIV LA
PĂSĂRI**

**PART I. ANATOMICAL AND MORPHOPHYSIOLOGICAL
FEATURES OF THE DIGESTIVE TRACT IN BIRDS**

I.1 Morfofiziologia tractului intestinal la păsări

Lungimea tubului digestiv a speciilor aviare este relativ mai scurtă decât cea a mamiferelor iar cea mai mare parte a acestei scăderi relative se află în regiunea intestinală. Prin urmare păsările au o suprafață mai mică pentru digestie și absorbție decât mamiferele. Astfel hrana rămâne pentru o perioadă mai scurtă în intestin iar recuperarea substanțelor nutritive din hrană se face într-un timp limitat (Colin et al, 2014). Intestinul la păsări respectă planul de structură al intestinului de mamifer, cu excepția unor particularități care interesează mucoasa și submucoasa.

Mucoasa prezintă vilozități pe toată lungimea intestinului, inclusiv în cloacă. În lamina propria glandele sunt mai rudimentare decât la mamifere. Acestea sunt mai rare, mai puțin adânci, captușite cu un epiteliu bogat în celule caliciforme. Glandele sunt separate prin teritorii mezenchimale dezvoltate. Regiunea bazală a glandelor reprezintă centrul de reacție, în jurul căruia se concentrează mezenchimul și se metaplaziază. Funcția este mult mai intensă în porțiunea de intestin gros în care, în ontogeneza posteclozională se diferențiază masiv țesutul limfoid, reprezentat de limfonoduli.

Mucoasa cloacală în porțiunea proctodeumului prezintă numeroase vilozități, unele dreptunghiulare pe secțiune, altele cu suprafața rotunjită, acoperite de un epiteliu monostratificat cu numeroase celule caliciforme și celule columnare cu microvili scurți. Epiteliul manifestă metabolism similar celulelor din mucoasa intestinului terminal. Spre piele, epiteliul cloacal, se modifică gradual, devenind stratificat (Cotea, 2012).

Tractul digestiv al păsărilor de curte este complet din punct de vedere anatomic în momentul ecloziunii însă capacitatea sa fiziologică digestivă și absorbtivă este mai mică în comparație cu cea a păsărilor mature. Dezvoltarea corpului după ecloziune necesită cantități crescute de nutrienți ceea ce determină modificări morfologice și fiziologice în tractul digestiv, în special în intestine. Mucoasa intestinală este esențială pentru digestia și absorbția multor nutrienți prin intermediul receptorilor membranari ai enterocitelor și al proteinelor din citosol, ceea ce indică faptul că digestia și absorbția sunt legate de suprafața luminală a intestinului (Maiorka et al, 2014).

Intestinul subțire este segmentul aparatului digestiv unde au loc cele mai importante procese ale digestiei. Cuprinde trei porțiuni: duoden, jejun și ileon și este structurat din: mucoasă, submucoasă, musculară și seroasă. Mucoasa intestinală prezintă unele particularități structurale destinate măririi considerabile a suprafeței sale absorbtive precum pliurile circulare, vilozitățile intestinale care

măresc de 5 ori suprafața mucoasei, enterocitele cu microvilozități la polul apical, care măresc de 10 ori suprafața absorbtivă a fiecărei celule în parte, prezența glandelor în lmina propria (glandele Lieberkuehn) (Cotea, 2012). Intestinul subțire produce multiple enzime digestive dar și lipază, aminopeptidază, zaharoză/izomaltază, maltază, amilaza și tripsină. Activitatea enzimelor digestive scade la distanță de duoden. Aminopeptidazele legate de membrană pe enterocite, au cea mai mare expresie în ileon. Mucusul este produs în intestinul subțire. Celulele caliciforme secretă glicoproteina bogată în treonină, prolină și mucina 2 (MUC2). Odată cu adăugarea de treonină în dieta bazală există o expresie crescută a mucinei 2 atât în jejun, cât și în ileon. Între ziua 19 de dezvoltare embrionară și ecloziune are loc o creștere a numărului de celule caliciforme dar și o creștere suplimentară până la 3 zile după ecloziune. Tosis bacitracina metilen disalicilat (BMD) a dus la scăderea numărului de celule caliciforme în ileon. În duoden se adaugă efectul sucului pancreatic asupra conținutului digestiv.

Pancreasul aviar produce un spectru complet de enzime inclusiv: lipaza, amilază, chimotripsinogen, procarboxipeptidază cât și membri ai subfamiliilor de tripsină cationică și anionică. Pancreasul la pui exprimă două forme majore de tripsinogen: tripsinogenul I, la care predomină subfamilia tripsinei cationice, și tripsinogenul II la care predomină subfamilia tripsinei anionice.

Concentrația fiziologică de acetilcolină și polipeptida intestinală vasoactivă VIP crește secreția enzimelor din pancreas la pui, însă la concentrații fiziologice colecistochinina, secretina și gastrina nu au efect. Bila se scurge din lobul stâng al ficatului în duoden prin intermediul canalului hepatic. Lobul drept comunică cu vezica biliară și, indirect, cu duodenul prin intermediul canalului cistic. La găinile ouătoare se eliberează aproximativ 190 ml de lichid biliar pe zi. Bila conține acizi biliari (săruri), pigmenti și proteine care ajută la digestia lipidelor. Acizii biliari ai găinilor sunt acidul dihidroxicolanic (la o concentrație de 105 mM) și acidul trihidroxicolanic (21 mM). Peste 90% din acizii biliari sunt reabsorbiți. Există concentrații ridicate de IgA (1,7 gL⁻¹) în bila puiului. Din punct de vedere cantitativ cea mai mare parte a digestiei și absorbției are loc în intestinul subțire. Suprafața interioară a intestinului este pliată în mod complex pentru a-i mări considerabil suprafața. Vilozitățile conțin celule epiteliale specializate pe suprafața lor, fiecare dintre acestea având proiecții extinse de pe suprafața luminală, numite microvilli. În interiorul vilozităților, sub celulele epiteliale, se află lamina propria, care conține țesut conjunctiv, capilare, mușchi netezi și fibre nervoase (Turk et al, 1982).

I.1.1. Particularitățile fiziologice ale intestinului la păsări

Funcția principală a intestinului este cea de absorbție, la îndeplinirea căreia contribuie enterocitele, care prezintă platoul striat (microvilozități la ME); capilarele, chiliferul central și mușchiul lui Brucke care înlesnește mișcările vilozităților (Cotea, 2012). Nutrienții sunt absorbiți de enterocitele din lumenul intestinal prin absorbție activă și pasivă. Transportatorii cu ancorare în membrană sunt responsabili pentru majoritatea mecanismelor de transport activ prin membrana. Proteinele sunt digerate cu ajutorul proteazelor și peptidazelor. Astfel rezultă peptidele și aminoacizii care servesc în primul rând ca blocuri de construcție pentru componente structurale și metabolice. Membrana apicală a enterocitelor este formată dintr-un simportator peptidic protonic electrogen desemnat ca peptidă H⁺-dependentă de peptide transportor 1, PepT1 implicate și în transportul medicamentelor asemănătoare peptidelor ("peptidomimetice"), cum ar fi antibioticele β -lactamice, medicamentele anti virale și agenți anticancerigeni.

Acesta are capacitatea de a absorbi fiecare di- și tripeptidă posibilă eliberată din descompunerea proteinelor alimentare. Peptidele sunt absorbite mai rapid și mai eficient decât aminoacizii liberi în intestinul subțire. PepT1 descris la mamifere dar și la pui (cPepT1) este alcătuit din 714 aminoacizi și are o greutate molară totală de cu 79,3 kDa. cPepT1 prezintă mai multe caracteristici asemănătoare cu PepT1 de mamifere, inclusiv 12 domenii transmembranare cu o buclă extracelulară între domeniile transmembranare 9 și 10 iar afinitatea de legare și eficiența de transport a PepT1 depind de dimensiunea substratului, sarcina, hidrofobicitatea, amino și modificările terminațiilor amino și carboxi, flexibilitatea lanțului lateral, prezența prolinei și stereospecificitatea. Di sau tripeptidele și alte substraturi ale PepT1 sunt transportate de un mecanism de transport cuplat cu protoni. Acest mecanism este dependent de gradientul de pH și de potențialul negativ membranar intracelular. Cea mai mare expresie a ARNm PepT1 la pui este observată în intestinul subțire cu expresie scăzută în rinichi și cecum.

De asemenea PepT1 poate fi o dovadă a maturității enterocitelor, deoarece expresia proteinei scade de la apex la baza vilozității și este reglată la pui pe cale de dezvoltare. ARNm PepT1 crește de 14 până la 50 de ori de la stadiul embrionar din ziua 16 a dezvoltării embrionare până în ziua de ecloziune. Expresiei genei PepT1 este influențată și de dieta păsărilor. Shiraga et al. (1999) și Walker et al. (1998) au arătat că odată cu creșterea nivelurilor de peptide alimentare, nivelurile de expresie a ARNm PepT1 au crescut (Gilbert et al, 2010). Aminoacizii liberi (neutri, cationici și anionici) sunt transportați în enterocite prin intermediul transportori de AA de la marginea în perie. Acești transportori prezintă diferite specificități de substrat, însă de cele mai multe ori specificitățile sunt suprapuse.

Transportatorul 3 de aminoacizi excitatori - EAAT3 este considerată o reacție Na^+ - dependentă de aminoacizi pe membrana apicală, cu o afinitate mare pentru aminoacizii anionici. Începând cu stadiile embrionare târzii până la cele de după ecloziune în intestinalele puiilor au fost raportați transportori de aminoacizi ileonul fiind un loc important pentru asimilarea acizilor grași liberi la puii în creștere. Glucoza este principala monozaharidă disponibilă în dieta animalelor de fermă și este principala sursă de energie asimilată în enterocite de către cotransportatorul de glucoză dependent de sodiu - SGLT1 care este compus din 14 domenii transmembranare. Acesta are o greutate preconizată de cca. 73 kD și este foarte bine exprimat în intestinului subțire.

Proteina SGLT1 este prezentă la mai multe specii, inclusiv la pui. Studii privind distribuția celulară a SGLT1 la pui au arătat că transportatorul specific de nutrienți, similar cu transportorul de peptide uman 1- Pep1, nu este exprimat în criptele enterocitelor însă este exprimat pe toată lungimea vilozității. SGLT1 intestinal este singurul transportor intestinal de glucoză cunoscut la pui, iar glucoza joacă un rol semnificativ în homeostazia energetică globală. SGLT 1 co-transportă o moleculă de Na^+ și o moleculă de glucoză în enterocite. Absorbția de glucoză facilitează, de asemenea absorbția lichidului paracelular. Glucoza transportată în citosol de către SGLT1 părăsește celula la suprafața bazolaterală prin transportul facilitat de transportorul 2 (GLUT2).

Expresia SGLT1 la pui este reglată de diferiți factori inclusiv compoziția alimentară și dezvoltarea intestinală. Există în general o secreție duodenală netă a unor acizi grași, mai ales a acizilor linoleic și palmitic iar în urma digestiei proteinelor, aminoacizii, dipeptidele și tripeptidele rezultate sunt absorbite în intestinul subțire aviar. Jejunul este principalul loc de absorbție a aminoacizilor, dipeptidelor și tripeptidelor, fapt demonstrat pe baza studiilor in vivo. Absorbția metioninei din jejun este mai mare decât cea din duoden. Există, de asemenea, o absorbție a acidului linoleic, stearic și palmitic în ileon. Însă in vitro rata de absorbție a metioninei este mai mare în ileon decât în jejun. Există o diferență relativ mică în ceea ce privește expresia transportorului peptidic dependent de H^+ 1 (PepT1) și a celor 10 transportori de aminoacizi (rBAT, bo,+AT, ATBo,+, CAT1, CAT2, LAT1, y+LAT1, y+LAT2, BoAT și EAAT3) pentru cele trei regiuni diferite ale intestinului subțire la puiul de găină.

În intestinul subțire, tripsinogenul și chimotripsinogenul sunt activate prin clivaj proteolitic în tripsină și chimotripsină. Proteinele sunt supuse digestiei enzimatică în intestinul subțire de către enzimele: tripsina, chimotripsina și aminopeptidaza. Există o expresie jejunală foarte scăzută a subunităților canalului de sodiu non-neuronal (SCNN): SCNN 1a, SCNN 1b, SCNN 1g și SCNN 1d care

alcătuiesc canalul de sodiu sensibil la amiloridă. Absorbția maximă a acidului folic are loc în duoden și jejun. Funcționarea intestinului subțire este controlată atât de factori neuronali, cât și hormonal. Are loc un control stimulator atât colinergic, cât și serotoninergic. În submucoasa ileonului sunt prezente numeroase fibre nervoase colinergice și corpuri celulare ce pătrund în mucoasă. În glandele și vilozitățile mucoasei ileonului și colonului se găsesc celulele care conțin serotonina ce stimulează contracția mușchilor netezi ai ileonului. La nivelul mucoasei există o rotație marcată a celulelor acestea în intestinul subțire, celulele proliferante găsindu-se în principal în vilozități și cripte. Celulele mucoasei migrează departe de cripte de-a lungul vilozităților după care mor. Celulele apoptotice sunt identificate în apropierea vârfurilor vilozităților. Ulterior celulele care mor se desprind și apoi sunt probabil, digerate. Timpii estimați de reînnoire a celulelor mucoasei din intestinul subțire de pui sunt: duoden - 111 ore, jejun - 55 de ore și ileon - 89 de ore. Prin urmare rezultă un sindrom de malabsorbție cauzat de degenerarea criptelor ce prezintă apoptoză crescută în intestinul subțire al puiului (Miska et al, 2015).

Structura histologică a colonului la păsări

Structura generală a colonului este similară cu cea a intestinului subțire, cu straturi de mucoasă și mușchi netezi circulari și longitudinali. Colonul prezintă mucoasa mai groasă prin faptul că glandele Lieberkuhn sunt mai lungi, formate din aceleași tipuri de celule (Cotea, 2012).

Colonul are rol și în absorbția apei, după cum o dovedește necesitatea unui aport ridicat de apă la puii colostomizați. Acizii grași volatili produși în fermentația cecală pot influența reabsorbția de sodiu în colon fiind important și pentru metabolismul azotului. Colostomia scade utilizarea azotului la puii masculi adulți hrăniți cu o dietă săracă în proteine. Bacteriile proteolitice prezente în colon pot avea rolul de a degrada proteinele rezultate din fermentația cecală. Transportul de sodiu și clorură are loc prin peretele colonului. Absorbția de ioni de potasiu este indeplinită de către colonocite. De asemenea în colon este absorbit și acidul folic. În colon există mai mulți transportori de sodiu: - Cotransportorul sodiu-glucoză (și aminoacizi) întâlnit în cazul unui aport ridicat de sare - Canalul de sodiu sensibil la amiloridă (întâlnit în cazul unui aport scăzut de sare și/sau în prezența aldosteronului). Canalul de sodiu sensibil la amiloridă este alcătuit din patru subunități ale canalului de sodiu non-neuronal (SCNN), respectiv SCNN 1a, SCNN 1b, SCNN 1g și SCNN 1d. Analogul metioninei, acidul 2-hidroxi-4-(metiltio) butanoic (Alimet) este absorbit în colonul de pui, precum și în intestinul subțire.

Funcția colonului. Colonul prezintă contracții de lungă durată și de scurtă durată; ambele tipuri pot fi spre cloacă sau în direcție inversă. Există atât contracții peristaltice care deplasează conținutul intestinal spre cloacă, cât și antiperistaltice retrograde care deplasează conținutul cloacal prin colon în cecum. În colon există două tipuri de contracții: lungi și lente ale mușchilor longitudinali și peristaltice mici, rapide ale mușchilor circulari. Colonul este controlat atât neuronal și endocrin. În plexurile din colon întâlnim corpuri neuronale colinergice și fibre nervoase împreună cu fibre noradrenergice (Colin et al, 2014)

I.1.2. Histologia funcțională a cecumului la păsări

Cecumul este precum un sac cu terminație oarbă care se proiectează ca un deget din colonul proximal. Prezintă o lungime de 15-18 cm la puiul adult. Conținutul intestinal pătrunde în cecum din ileon sau prin transport retrograd din colon. Intrarea în cecum la pui este influențată de dimensiunea particulelor. Particulele solubile foarte mici intră ușor însă nu și cele de dimensiuni mai mari. Cecumul prezintă funcții importante, printre care: absorbția de sodiu, clorură și apă, secreția/excreția de produși azotați, precum acidul uric. De asemenea aici are loc fermentarea conținutului intestinal rezultând nutrienți cum ar fi acizii grași volatili și vitaminele disponibile pentru absorbție. Creșterea nivelului de hidratare a excrementelor susține absorbția apei de către cecum și a consumului de apă în urma cecostomiei. Există un transport de sodiu și clorură prin peretele cecumului. Microorganismele din cecum fermentează conținutul intestinal (Holt et al, 2011) Cecumul reprezintă spre exemplu principala sursă gastro-intestinală pentru producerea de acizi grași volatili precum acidul acetic, propionic și butiric. În prezența acizilor grași volatili (acetat, propionat și butiric) sau a glucozei, se produce absorbția electrogenă de sodiu și secreția de clorură la nivelul cecumului. Tot la nivelul cecumului are loc o sinteză marcantă a vitaminelor, în special a riboflavinei, a acidului pantotenic și a acidului nicotinic dar nu și a celor fără germeni, hrăniți cu o dietă fără vitamina B. Se crede că amoniacul este încorporat în aminoacizi de către microorganismele cecale, cu o anumită absorbție a aminoacizilor în cecum. Capacitatea cecumului de a utiliza cantități semnificative de azot neproteic din alimentație nu este suficient studiată.

Timpul de tranzit intestinal este influențat de fiziologia nutrițională. Tranzitul conținutului intestinal prin tractul gastro-intestinal al puiului este mai lent noaptea decât în timpul zilei. S-a observat o reducere a timpului de tranzit gastro-intestinal la pui în funcție de regimul alimentar, de exemplu, în cazul în care se utilizează coji de ovăz măcinate grosier sau o cantitate mai mare de treonină în alimentație. Timpul de tranzit intestinal la pui este influențat de hormoni,

corticosteronul scăzând în mod semnificativ viteza de tranzit. De asemenea sunt prezente efectele genetice asupra timpului de tranzit intestinal, cu modificări ale timpului de tranzit la puii selectați pentru o eficiență digestivă scăzută față de cea ridicată (Colin et al, 2014).

I.2. Bariera epitelială intestinală la păsări

Bariera intestinală constituie interfața dintre mediul extern și cel intern. O barieră intestinală funcțională permite absorbția substanțelor nutritive și a lichidelor, dar împiedică în același timp substanțele dăunătoare, cum ar fi toxinele sau bacteriile, să treacă prin epiteliul intestinal către țesutul subiacent. Există un echilibru delicat pentru a menține o barieră funcțională ce este menținut prin mecanisme de apărare fizică, incluzând atât complexe joncționale care leagă celulele epiteliale adiacente cât și suprafața mucoasei celulelor epiteliale. Următoarea parte a barierei intestinale este reprezentată de epiteliu, stratul unic celular care separă organismul de mediul luminal extern. Epiteliul este alcătuit din enterocite, celule Paneth și caliciforme. Aceste celule și funcțiile lor diferite formează o barieră strânsă față de mediul luminal intestinal. Celulele Paneth produc peptide antimicrobiene care contribuie la eliminarea bacteriilor patogene, în timp ce enterocitele răspund la stimuli nocivi prin secreția de clorură (Schoultz et al, 2020).

Epiteliul intestinal este foarte populat de limfocite intraepiteliale, celulele ucigașe naturale (NK). Celulele Natural Killer au fost descrise ca fiind limfocite granulare mari, atât cu funcții efectoare de citotoxicitate și de producere de cytokine. Astfel, acestea joacă un rol important în prima linie de apărare împotriva agenților patogeni invazivi în țesutul intestinal (Trinchieri et al, 2015). La pui, celulele NK sunt abundente în epiteliul intestinal, dar sunt mai puțin detectabile în sângele periferic și splină. De asemenea, a fost raportat că expresia celulelor NK la pui a fost minimă la puii de găină în timpul primelor săptămâni după eclozare, dar a crescut pe măsură ce păsările avansează în varsta. Pentru a menține o barieră funcțională, mai multe proprietăți mecanice ale celulelor epiteliale intestinale sunt esențiale și constituie diverse mecanisme de apărare, în care primul dintre ele este lumenul însuși. Aici, antigenii și bacteriile sunt degradate de sucurile biliare și de acizii gastrici și pancreatici (Chelakkot et al, 2018).

Sub epiteliul intestinal se află lamina propria formată din celule imune înnașcute și adaptative, cum ar fi neutrofilele, celulele T-reglatoare, macrofagele și mastocitele (Schoultz et al, 2020). Neutrofilele sunt printre primele celule care ajung în zonele inflamate și limitează invazia microorganismelor. Are loc eliminarea acestora prin fagocitoză. În mod similar, macrofagele din lamina

propria se află în apropierea enterocitelor și fagocitează potențialul conținut luminal dăunător care a străbatut bariera intestinală și au ajuns în lamina propria. Celulele T sunt esențiale în menținerea homeostaziei imune, deoarece sunt capabile să suprimă activarea diferitelor celule imune implicate în inflamația intestinală, precum și să inducă toleranța imună la antigene derivate din dieta sau din flora comensală. De asemenea, lamina propria conține sistemul endocrin și sistemul nervos enteric care joacă un rol important în homeostazia barierei intestinale. Mastocitele sunt situate în apropierea nervilor și pot fi activate de mediatorii neuronali și au fost implicate în mai multe tipuri de răspunsuri neuroinflamatoare, așa cum au fost analizate de Keita și colab.

O serie de studii au demonstrat că receptorii Toll-like (TLR) epiteliali intestinali provoacă un răspuns imunitar pentru a menține funcția de barieră (Cario et al, 2008). Sub stratul epitelial se află un strat subțire de țesut conjunctiv, lamina propria, care are un rol crucial în realizarea unei comunicări între microbiom și celulele imunitare. Sistemul epitelial intestinal găzduiește, de asemenea, celule imunitare, inclusiv celule dendritice, celule T, celule B și macrofage, care funcționează în strânsă legătură cu celulele epiteliale intestinale pentru a menține homeostazia intestinală.

Studii recente au raportat dovezi convingătoare privind rolurile metabolice, imunologice și fiziologice pe care le are microbiota intestinală. Bacteriile luminale comensale inhibă colonizarea agenților patogeni, de exemplu prin producerea de bacteriocine, modificarea pH-ului conținutului luminal și competiția pentru nutrienții necesari pentru creșterea bacteriilor și a agenților patogeni.

Următorul mecanism de apărare este micromediul intestinal care include glicocalixul, și stratul de mucus. Primul strat de apărare din epiteliul intestinului este format de un strat de mucus, care este esențial pentru limitarea expunerii celulelor epiteliale la microbiom (Chelakkot et al, 2018). Stratul de mucus formează un habitat protejat pentru flora comensală în imediata apropiere a celulelor epiteliale. Mucusul este compus din mucină produsă și secretată de către celulele caliciforme. În plus, stratul de mucus este alcătuit din IgA, unul dintre cei mai abundenți anticorpi în secrețiile mucoasei, care prin mai multe mecanisme diferite neutralizează agenții patogeni și favorizează menținerea florei comensale.

Homeostazia barierei intestinale este dependentă de relația dintre microbiota intestinală și epiteliul intestinal. Sistemul imunitar înăscut și, în special, receptorii de recunoaștere a modelelor (PPR) exprimați în enterocite (de exemplu, receptorii de tip Toll, receptorii de tip Toll-like, receptorii cu domeniu de oligomerizare a nucleotidelor ca receptori de tip nucleotide și gena I inductibilă de acid retinoic) sunt esențiali pentru homeostazia intestinului. Acești receptori recunosc

moleculele microbiene *pattern(tipice)* asociate cu microbii/patogenii (MAMPs/PAMPs) exprimate de majoritatea microbilor. Atașarea MAMPs/PAMPs la PPR-urile determină un răspuns inflamator imediat împotriva microorganismelor străine pentru a proteja gazda. Această interacțiune permite identificarea moleculelor străine de către celulele prezentatoare de antigen, cum ar fi celulele dendritice și macrofagele. Aceste celule migrează în continuare către zona periferică, unde ele prezintă antigenele celulelor T, ceea ce duce la producerea de citokine proinflamatorii, cum ar fi interferonul gamma (IFN- γ), chemokine și peptide antimicrobiene pentru a proteja bariera intestinală. Una dintre principalele cascade de semnalizare declanșate de IFN- γ care este implicată în menținerea barierei intestinale este activarea metabolismului triptofanului prin inducerea unor niveluri crescute ale enzimei indolamină 2,3-dooxygenază. Această enzimă este responsabilă de transformarea triptofanului în kynurenină care funcționează ca un ligand endogen al factorului de transcripție al receptorului de hidrocarburi arilice (AhR) care, în urma activării, are capacitatea de a inhiba răspunsurile inflamatorii în intestin și are un efect protector împotriva bolii inflamatorii intestinale.

În condiții normale, simbioza dintre microbiota intestinală și gazdă este bine echilibrată. Cu toate acestea, în anumite boli, cum ar fi boala inflamatorie intestinală, acest echilibru este rupt și contribuie la apariția inflamației intestinale. Evaluarea compoziției microbiotei intestinale, a metaboliților microbieni, precum și a markerilor inflamatori poate fi importantă pentru a cartografia mecanismele care stau la baza unei bariere intestinale perturbate (Chelakkot et al, 2018).

1.2.1. Permeabilitatea intestinală

O funcție crucială a epitelului intestinal este menținerea unei funcții de barieră corespunzătoare, care permite permeabilitatea nutrienților, apei și ionilor, dar limitează intrarea agenților patogeni și a toxinelor bacteriene. Permeabilitatea intestinală se definește ca fiind trecerea intestinală nemediată a unor substanțe de mărime medie (molecule hidrofiele de dimensiuni medii) care se produc spre un gradient de concentrație fără ajutorul unui purtător sistem de transport. Prin urmare, o permeabilitate intestinală crescută este un semn al unei funcții de barieră intestinală perturbate. Deoarece definiția permeabilității intestinale se referă la trecerea unui solut printr-o membrană simplă, iar membrana intestinală este formată din mai multe straturi și tipuri de celule diferite, este obligatoriu să se utilizeze simplificări atunci când se măsoară permeabilitatea intestinală. Permeabilitatea intestinală poate fi evaluată prin măsurarea rezistenței transepiteliale (TER), adică a capacității de difuziune pasivă, a încărcăturii ionice prin epiteliu, dar și prin măsurarea trecerii

soluțiilor prin epitelii prin diferite căi de trecere. Modificări ale modului de trecere a peptidelor prin epitelii sunt considerate a fi de mare importanță în fiziopatologia tulburărilor gastrointestinale. Chaperonii lipidici intracelulari cunoscuți sub numele de FABP sunt un grup de molecule care coordonează răspunsul și metabolismul lipidic în celule. FABP se găsesc la toate speciile, de la *Drosophila melanogaster* și *Caenorhabditis elegans* la șoareci și oameni, demonstrând o conservare evolutivă puternică. La vertebrate, nouă chaperoni au fost identificați până în prezent în intestin, ficat, creier, adipocite și mușchi, organe care prezintă rate ridicate de metabolizare a lipidelor. FABP intestinale, FABP2 și FABP6, sunt exprimate la niveluri ridicate în intestinul subțire și, respectiv, în ileon și, în plus față de medierea metabolismului lipidic, acestea sunt, de asemenea, implicate în condițiile inflamatorii intestinale prin modularea căilor critice sensibile la lipide în adipocite și macrofage la om. FABP2 este reglată în sens negativ la indivizii cu leziuni ale barierei intestinale induse de ischemie/reperfuzie, sugerând rolul important al FABP2 în sănătatea barierei intestinale. Mai multe FABP-uri (FABP1, FABP2, FABP6 și FABP10) au fost identificate ca fiind predominant exprimate în tractul digestiv al puilor; cu toate acestea, mai rămân multe de determinat în ceea ce privește expresia și funcțiile biologice ale acestora la păsările de curte. FABP2 este implicată în lipogeneză și în transportul acizilor grași și joacă un rol important în conținutul de grăsime abdominală la puii de carne. În anumite studii, la păsările cu funcția de barieră intestinală afectată s-a constatat reducerea expresiei genei FABP2, sugerând că, la fel ca rolul FABP2 în sănătatea barierei intestinale umane, FABP2 poate fi utilizat ca marker al funcției de barieră intestinală la pui. Reducerea expresiei FABP2 indică pierderea conținutului de celule epiteliale și apariția insuficienței barierei intestinale la păsările cu această problemă (Chen et al, 2015). Soluții pot trece prin epitelii intestinal fie între celule prin intermediul căii paracelulare fie prin celule pe cale transcelulară (Chelakkot et al, 2018).

1.2.2. Transportul transcelular

Transportul transcelular este un proces saturabil, activ, care se poate desfășura împotriva unui gradient de concentrație. Trecerea pe cale transcelulară poate avea loc în diferite moduri, în funcție de proprietățile solutului. Acest transport activ este mediat de diferite proteine transportoare de Ca^{2+} . Transportul de moleculele prin enterocite prin traversarea membranei apicale și bazolaterale se realizează prin intermediul căii de permeabilitate transcelulară.

Enterocitele au o polaritate apical-bazală definită de orientarea membranei apicale spre lumenul intestinal și orientarea bazală spre membrana bazolaterală.

Membrana bazolaterală este mai subțire și mai permeabilă decât membrana apicală datorită unui raport proteine:lipide mai mic. Transportul de molecule poate fi activ sau pasiv. Transportul de molecule împotriva concentrației/ gradientului de concentrație utilizând energia produsă de ATP este transportul activ. Difuziunea facilitată constă în transportul de molecule sau de ioni prin membrana intestinală prin intermediul unor proteine integrale transmembranare specifice, proces care nu necesită energie chimică din adenosin trifosfat (ATP) (Bronner et al, 2018).

Celulele absorbitive ale tractului gastrointestinal au adesea mecanisme specializate care permit absorbția eficientă a multor minerale solubile, chiar și atunci când concentrația acestora în alimentație este destul de scăzută, acest lucru fiind cunoscut sub numele de transport transcelular și este un proces ce se desfășoară în 3 etape. Mineralul se deplasează din fluidele digestive prin stratul de apă și prin glicocalix și ajunge la suprafața apicală a membranei. Pentru producerea absorbției, mineralul trebuie să fie solubil în fluidele digestive care acoperă suprafața celulară. Stratul dublu fosfolipidic care alcătuiește membrana celulară este total impermeabil pentru apă și minerale. Pentru a permite deplasarea unui mineral solubil în apă prin stratul dublu fosfolipidic în interiorul celulei, celula se folosește de canale transportoare minerale sau "ionice". Acestea sunt proteine specializate din membrana celulară care facilitează difuzia mineralelor. În general, acești transportatori se leagă de minerale numai dacă acestea se află în formă ionizată. În multe cazuri, transportatorii se leagă de mineral numai dacă acesta are o anumită încărcătură sau valență. Unele minerale traversează membrana apicală folosind proteine transportoare care acționează prin schimb de ioni; acestea aduc un tip de ioni în celulă, trimițând în același timp un alt ion, de obicei cu aceeași sarcină, în lumen pentru a menține electroneutralitatea. Procesele active de transport transcelular al mineralelor permit unui organism să absoarbă minerale din alimentație chiar și în situațiile în care acestea sunt prezente în concentrații foarte mici în lumenul intestinal. Mecanismele de transport sunt, în general, foarte specifice pentru un anumit mineral și ușor saturabile, ceea ce înseamnă că pot transporta doar o cantitate limitată de minerale într-un anumit interval de timp. Atunci când organismul are nevoie de un anumit element eficiența acestor sisteme de transport poate fi crescută sau scăzută atunci când organismul are rezerve suficiente. De asemenea, există antagoniști ai acestor procese de transport, spre exemplu un nivel ridicat de Fe din alimentație poate interfera cu absorbția de Zn prin intestinul subțire (Goff et al, 2017).

I.2.3. Transportul paracelular

La nivelul celulelor epiteliale și celulelor endoteliale se găsesc joncțiunile strânse, un element al complexului joncțional. Se formează astfel o centură între domeniul lateral al membranei plasmactice în apropierea polului apical, care servește ca o barieră primară pentru difuzia de soluturi, reglează transportul paracelular și permite polarizarea celulară. Joncțiunile strânse sunt compuse din punct de vedere structural din rețele de filamente proteice, numite filamente, care traversează spațiul extracelular pentru a interacționa cu joncțiunile strânse ale celulelor adiacente și au un rol primordial în menținerea integrității și a funcției de barieră paracelulară a celulelor epiteliale și endoteliale, prin reglarea trecerii ionilor și a soluțiilor prin spațiul paracelular restricționând mișcarea proteinelor între compartimentele bazolateral și apical. Capacitatea fiziologică de a acționa precum un sigiliu depinde de numeroși factori, cum ar fi valoarea tensiunii fizice exercitată asupra sigiliului, numărul de filoane, și componenta primară a proteinelor din filamente.

Proteinele care integrează joncțiunile strânse sunt tricelina, occludina, claudinele, molecula de adeziune a joncțiunii (JAM) și Marvel D3. Claudinele sunt proteine transmembranare cu o greutate moleculară cuprinsă între 20 până la 27 kDa. Acestea polimerizează liniar pentru a forma șiruri, stabilind interacțiuni transcelulare în cis între claudine din aceeași celulă și în trans între claudine ale celulelor adiacente, ceea ce determină permeabilitatea paracelulară, permeabilitatea epitelială, polarizarea epitelială și conservarea rezistenței transepiteliale și trecerea selectivă a moleculelor și a ionilor. Familia formată din proteine multigenice cuprinde cca 27 de membri la om și șoareci, specii la care majoritatea acestor proteine au fost studiate. Totuși, prezența lor a fost observată și în diferite organe la embrionii de pui și la păsările adulte.

Aceste proteine transmembranare sunt grupate în claudinele de sigilare și claudine formatoare de canale. Spre exemplu, claudina 7, poate acționa ca o barieră sau ca un canal în funcție de context. Claudinele 2, 10 și 15 intervin în trecerea cationilor; claudinele 10 și 17 sunt implicate în trecerea anionilor, iar claudina 2 în trecerea apei. Proporția de combinare a membrilor acestei familii de proteine și diferențele de densitate determină proprietățile de canal și de barieră ale joncțiunilor strânse. De asemenea, joacă un rol esențial în generarea de tuburi epiteliale, lumenuri, și rețele tubulare în timpul formării organelor (Günzel et al, 2013).

Reducerea expresiei claudinei-3 a provocat creșterea permeabilității. Asocierea claudinei-3 cu joncțiunile "mai strânse" a fost, de asemenea, raportată la

șoareci, unde expresia claudinei-3 a fost detectată în ansa ascendentă a lui Henle, tubului convoluți distali și canalul colector (unde joncțiunile epiteliale sunt strânse), dar a fost absentă în segmentul proximal, unde joncțiunile strânse sunt mai puțin etanșe. În studiul efectuat pe pui de o zi, proteina claudină-3 a fost slabă sau absentă în regiunile cripte unde sunt localizate celulele stem intestinale și joncțiunile strânse sunt relativ permeabile. Expresia claudinei-4 duce la îmbunătățirea proprietăților de barieră, de aceea este esențial să se identifice claudinele prin determinarea prezenței ARNm de claudină în tunica mucoasă a diferitelor regiuni ale intestinului la puii în vârstă de 7 săptămâni. Aceasta este o etapă fundamentală pe calea elucidării rolului lor specific. Claudina-5 (23 kDa, 218 AS) ce este o claudină formatoare de bariere, joacand un rol principal și se găsește în cantități mari în endoteliul cerebral, dar și în endoteliile diferitelor alte organe, de exemplu, ale pielii, ficatului, rinichilor și plămânilor iar organele cu expresie epitelială a claudinei-5 sunt intestinul și pancreasul. De asemenea a fost detectată în cardiomiocite.

Observațiile studiilor indică faptul că claudina-5 este localizată în principal în regiunile strânse și funcționale intestinale ale puilor și spre deosebire de claudina-3, expresia proteinei claudina-5 a fost cea mai puternică în regiunile criptelor și vilozităților inferioare ale epiteliului intestinal la puii eclozați în prima zi de viață. S-a raportat că proliferarea celulară în intestinul puilor este cea mai mare în epitelul de la nivelul criptelor. Spre deosebire de mamifere, proliferarea are loc și în vilozități, cu un număr tot mai mic de celule în diviziune spre vârful vilozității (Uni et al., 1988). Astfel, distribuția proteinei claudină-5 de-a lungul axei criptă-vilozități pare similară cu modelul de proliferare epitelială în timpul perioadei inițiale post eclozionare (Ozkan et al, 2010).

Proteina Claudin-16 nu a fost detectată între 12 și 18 zile ale dezvoltării embrionare dar a fost prezentă în celulele epiteliale de la vârful vilozităților lungi până la 20 de zile. La 1 zi după Claudina-16 a fost găsită în celulele din regiunea superioară a capilarelor vilozităților chiar în prima zi după ecloziune. Între 18 și 20 de zile de dezvoltare se remarcă o creștere dramatică a claudinei-16 în concordanță cu apariția proteinei la 20 de zile. Nivelul ARNm claudin-16 a scăzut după ecloziune în aceeași perioadă în care expresia proteică (intensitatea imunomarcației) a crescut. Acest lucru ar putea fi explicat printr-o creștere a ratei de traducere a transcripțiilor claudin-16 în momentul în care se știe că rata metabolică a epiteliului crește.

Cu toate acestea fenomenul este foarte probabil, întrucât celulele epiteliale conțin în mod clar claudina-16 și deoarece celulele caliciforme apar în ziua în care expresia epitelială a claudinei-16 a crescut de 9,7 ori. Unii markeri ai diferențierii

funcționale a celulelor epitelului intestinal cum ar fi activarea enzimei microvilozităților și transportatorii de nutrienți sunt cunoscuți ca fiind în creștere rapidă de-a lungul celor 2-3 zile care preced ecloziunea. Însă unii dintre aceștia scad apoi la 1-2 zile după ecloziune, model urmat de nivelurile relative ale tuturor celor 3 transcripții de claudină.

La mamifere și păsări occludina este o proteină foarte bine conservată și este prezentă în celulele care formează joncțiuni strânse. În funcție de specie există o variație a dimensiunii occludinei. Occludina nu este esențială pentru asamblarea unei joncțiuni strânse, dar este importantă atunci când limitează permeabilitatea funcțională. Absorbția intestinală are loc prin trecerea moleculelor prin celulă și prin transport paracelular. La baza tranzitului paracelular funcționează prin unul dintre următoarele mecanisme: calea "porilor", care este de capacitate redusă și permite trecerea ionilor și a soluțiilor mici sau calea de "scurgere" care permite trecerea moleculelor mici și mari precum ioni și soluturi neîncărcați într-un mod neselectiv, neuniform. Această cale implică ruperea firelor sau formarea tranzitorie de spații paracelulare. Secvența de aminoacizi cu bucle extracelulare determină interacțiunile iar claudinele formează claudine homotipice și interacțiuni heterotipice, astfel încât există un potențial considerabil pentru diverse interacțiuni și caracteristici ale porilor.

Tubul digestiv al păsărilor este mai scurt și mai simplu decât cel al mamiferelor. Cu toate acestea, este foarte eficient pentru procesele de digestie și absorbție ale nutrienților.

În epiteliul intestinal al păsărilor, 90% din substanțele (ioni, nutrienți, etc.) sunt absorbite prin porii cu diametrul de 4 până la 8 nm, care sunt prezenți în joncțiunile strânse. Acest lucru ar putea explica de ce păsările au o capacitate de absorbție mai mare a metaboliților hidrosolubili în comparație cu mamiferele. De asemenea s-a observat faptul că alterările în expresia proteinelor joncțiunilor strânse cauzează modificări ale funcției barierei paracelulare bazate pe claudină fiind legate de dezechilibrul absorbției apei, apariția inflamației. Rolul preponderent în timpul absorbției intestinale la păsări este jucat de joncțiunile strânse.

Proteinele joncțiunilor strânse ce mediază proprietățile de barieră paracelulară ale celulelor epiteliale sunt reglementate prin mai multe mecanisme cum ar fi: modificările în expresia ARNm, post-tranlaționale ale proteinelor joncțiunilor strânse și procese de fosforilare la capătul lor C-terminal. Acestea procese de fosforilare sunt mediate de diferite kinaze, de exemplu, lanțul ușor al miozinei sau Rho kinaza și sunt asociate cu inserția sau eliminarea proteinelor joncțiunilor strânse din membrana celulară. Unul dintre agenții de rezistență ai

barierei intestinale este quercetina. Tot de la 18 la 20 de zile nivelurile de transcripție ale ZO-2 scad și ating un nivel și mai scăzut la 2 zile după ecloziune iar acest lucru indică faptul că de expresia proteinelor de la nivelul joncțiunilor intestinale nu sunt toate la fel. Una dintre proteinele adaptoare responsabile de conectarea joncțiunilor strânse la citoschelet este Zonula Ocludens-2. De asemenea se crede ca inițiază localizarea corectă a claudinelor și formarea joncțiunilor strânse. Este posibil să fie destul de semnificativ faptul că nivelurile de transcripție ale ZO-2 sunt ridicate cu 2 zile înainte de creșterea transcriptelor de claudină și înainte de mutarea proteinelor claudină -3 și -5 către celulele epiteliale. Sunt necesare studii suplimentare pentru a elucida rolul potențial al ZO-2 în orientarea claudinelor în timpul dezvoltării epiteliale. Amplasarea claudinelor -3 și -5 în interiorul intestinului puiilor sugerează o funcție a acestor proteine în epiteliul intestinal (Ozkan et al, 2010).

1.3. Țesutul limfoid asociat intestinului la păsări

La animalele monogastrice, mucoasa gastrointestinală reprezintă o linie de apărare împotriva agenților patogeni din mediul înconjurător. Pentru a lupta împotriva agenților infecțioși și potențial dăunători, în intestin s-a dezvoltat un sistem complex de țesut limfoid în submucoasă și mucoasă.

Țesutul limfoid care este asociat cu tractusul gastrointestinal reprezintă o primă linie de apărare împotriva antigenilor dăunători care pătrund în organism în timpul hrănirii și respirației și în funcție de localizare, este prezent sub formă de agregate de celule limfoide și, de asemenea, sub formă de celule organizate în foliculi limfoizi și amigdale (Casteleyn et al, 2010). Țesuturile limfoide asociate cu mucoasa sunt foarte dezvoltate la pui, în numeroase locații și în special în tractul gastrointestinal și includ structuri unice la păsări, precum diverticulul lui Meckel și amigdalele cecale. Țesutul limfoid asociat intestinului de pui este alcătuit dintr-un număr de țesuturi și celule care sunt responsabile de menținerea homeostaziei intestinale și de generarea răspunsurilor imune la nivelul mucoasei.

Sistemul TLAMD are ca trăsătură caracteristică producerea de anticorpi IgA și cuprinde peste 2/3 din toate celulele limfoide ale întregului sistem imunitar. Aproximativ 80% din toate imunoglobulinele și 50% din limfocite sunt produse în intestin. Ig sunt secretate pe suprafețele mucoaselor și principala lor funcție implică captarea antigenului. De asemenea, împiedică trecerea antigenelor prin mucoasă în organism și sunt captate de celule specializate prezentatoare de antigen (APC), care secretă citokine adecvate, determinând astfel apariția sau dispariția inflamației (Kiczorowska et al, 2017). Tractul gastrointestinal este bogat în celule mieloide și limfoide. Multe dintre aceste celule rezidă în țesuturile limfoide organizate. TLAMD este un sistem imunitar cheie, estimându-se că este compus

din mai multe celule imunitare decât orice alt țesut (Smith et al, 2008). Structurile asociate formează un loc care favorizează colocalizarea numeroaselor tipuri de celule imune necesare pentru a iniția și media funcția imunitară. Multe dintre structurile sale organizate sunt situsuri de inducție imună care asigură condițiile necesare pentru a induce răspunsuri imune adecvate (de exemplu, producția de IgA de către plasmocite) (Tomonori et al, 2018). Țesuturile limfoide au o structură bine organizată. Acesta este compus dintr-un spațiu interfolicular în care se acumulează celulele T, iar celulele B formează foliculi; toate acestea sunt acoperite de epitelii asociat foliculilor specializat (FAE).

Pe lângă țesuturile limfoide organizate, limfocitele solitare și agregatele din lamina proprie conțin atât celule B, cât și celule T. Celulele CD8⁺ sunt răspândite în toată lamina proprie. Majoritatea celulelor T exprimă CD4, plasmocitele Ig M⁺ și IgY⁺ sunt în principal localizate între cripte. Plasmocitele IgA⁺ sunt adesea dispuse difuz din cripte până la vârfurile vilozităților. Macrofagele exprimă antigenul complexului major de histocompatibilitate (MHC clasa II) și conțin fosfatază acidă și sunt localizate în spațiul subepitelial. Numărul de celule crește la păsările mai în vârstă, dar vârsta nu influențează modelul de distribuție caracteristic al acestor limfocite (Smith et al, 2008).

Epiteliul care căptușește țesutul limfoid organizat se caracterizează prin microvilli neregulați, numeroși tubuli apicali, vezicule și vacuole și citoplasmă densă. Plăcile Peyer, CT, bursa lui Fabricius și diverticulul lui Meckel, nu sunt dispuse ca în cazul vilozităților și glandelor intestinului. Se mai poate adăuga că, epitelii este adesea aplatizat, lipsit de celule caliciforme producătoare de mucus. Celulele conțin fosfatază alcalină, în timp ce epitelii vilozităților co-lunare nu conține fosfatază. Limfocitele pătrund în epitelii pentru a forma un limfoepitelii, cu excepția bursei lui Fabricius (Liebler, 1986).

Amigdalele pilorice. Foliculii limfoizi secundari mici și regiunile celulare T interfoliculare sunt prezente în peretele părții proximale a duodenului lângă sfincterul piloric. Când acest inel de țesut limfoid este bine dezvoltat, termenul de amigdală pilorică poate fi folosit pentru a desemna acest TLAMD. Conform lui Nagy & Ola'h (2007), această amigdală este formată din 15 până la 20 de unități amigdalene care sunt încapsulate de țesut conjunctiv. Țesutul limfoid prezent în fiecare unitate este organizat în jurul unei cripte centrale, care este o criptă Lieberkuhn transformată, care este căptușită de un epitelii infiltrat în principal de limfocite T. Unele celule M au fost observate și în acest țesut limfoid. Deși nu a fost atribuit încă o funcție exactă amigdalelor pilorice, aceasta ar putea compensa potențial absența ganglionilor limfatici mezenterici la păsări. La mamifere, acești ganglioni limfatici formează o barieră secundară împotriva diseminării antigenelor

din TLAMD. Împreună cu amigdalele esofagiene, amigdalele pilorice aviare controlează răspândirea antigenelor în sânge prin intermediul vaselor limfatice mezenterice. Lamina propria a părții proximale a duodenului conține foliculi limfoizi primari și secundari și regiuni interfoliculare amigdalene pilorice aviare care controlează răspândirea antigenelor în sânge prin intermediul vaselor limfatice mezenterice.

Plăcile Peyer. Până la șase placi Peyer diseminate sunt prezente la partea anti-mezenterică a jejunului la pui. Aceste structuri limfoide sunt denumite și amigdale intestinale. Una dintre plăcile Peyer este localizată în mod constant în ileon, 5-10 cm proximal la nivel ileo cecal. Plăcile Peyer sunt foarte asemănătoare cu cele ale mamiferelor. Țesutul lor limfoid nu este localizat numai în lamina propria, ci pătrunde și în submucoasă; fiind format din foliculii limfoizi primari și secundari care conțin în principal limfocite B și sunt separate prin regiuni interfoliculare bogate în limfocite T.

Epiteliul de acoperire a plăcilor Peyer este format din enterocite nediferențiate și este puternic infiltrat cu celule limfoide. Acest limfo-epiteliu este responsabil pentru contactul intim dintre chim și sistemul imunitar intestinal. La fel ca la mamifere, Celulele M cu microvili apicali sunt cele mai importante celule de prelevare de antigen prezente în limfo-epiteliul intestinal aviar. Plăcile Peyer se dezvoltă foarte rapid. La puii nou eclozionați, plăcile lui Peyer nu sunt vizibile macroscopic, dar infiltrațiile de celule limfoide sunt vizibile microscopic în unele locuri. De la vârsta de 10 zile, ei pot fi văzuți macroscopic. Volumul lor crește semnificativ până la vârsta de 3 luni. Datorită atrofiei ulterioare după 1 an, doar o singură placă Peyer rămâne și se află în apropierea zonei de tranziție dintre ileon și cecum.

Diverticulul lui Meckel. Diverticul lui Meckel, oficial numit diverticulum vitellinum, este rămășița sacului cu gălbenuș și care, în timpul embriogenezei, conectează sacul de gălbenuș cu lumenul intestinal. Este vizibil macroscopic la 60% dintre găinile adulte și porumbei sub formă de cupolă sau proeminență vermiformă la partea anti-mezenterială a peretelui jejunal, ușor distal de regiunea mijlocie a acestui segment intestinal. Nu poate fi găsit în mod constant la păsările adulte, și este, de asemenea, absent la 20% dintre rațe și 10% la găște. La cele patru specii aviare menționate mai sus, diverticulul lui Meckel persistă în timpul vieții, întrucât dispare devreme în viața altor păsări.

Imediat după eclozare, diverticulul lui Meckel este foarte mare și plin de gălbenuș. Potrivit lui Besoluk și colab. (2002), țesutul limfoid al diverticulului lui Meckel începe să se dezvolte la pui de la 5 la vârsta de 7 săptămâni. Cu toate acestea, au fost observate mici agregări de macrofage și limfocite la pui de carne

de 2 săptămâni de către Teirlynck (2009).Țesutul limfoid complet matur este prezent de la vârsta de 10 săptămâni și rămâne activ până la vârsta de 21 de luni. În diverticulul lui Meckel se găsesc granulocite, monocite și un număr mare de plasmocite, dar fără eritrocite sau trombocite. Prin urmare funcția diverticulului Meckel este dublă și constă în cea de hrănire a păsării în primele zile de viață și cea de acțiune ca un organ mielopoietic în etape ulterioare. Un diverticul tipic al lui Meckel seamănă cu un apendice atașat la peretele jejunal. În regiunea centrală, țesutul limfoid este organizat în foliculi limfoizi primari și secundari și acumulări de celule limfoide interfoliculare. Țesutul limfoid este situat în jurul lumenului intestinal, care pe alocuri este captușit de un limfo-epiteliu.

Amigdalele cecale. Un grup mare de agregate de țesut limfoid este situat în peretele medial al cecumului și tranziției lui în rect. Amigdalele cecale sunt compuse din mai multe unități amigdaliene care constau în foliculi limfoizi secundari cu regiuni de celule T intercalate situate în jurul unei fose centrale. Această fosă se ramifică în mai multe cripte care au legături directe cu lumenul cecal. Criptele sunt căptușite de un limfo-epiteliu care conține unele celule M diseminate între coloane de celule epiteliale. Diferitele unități amigdale sunt separate de unitățile lor învecinate prin septuri de țesut conjunctiv. Deși amigdalele cecale apar la sfârșitul etapei embrionare, dezvoltarea lor majoră are loc după eclozare. În prima zi după eclozare ambele limfocite B și T se formează, dar numărul de limfocitele T îl depășește pe cel al limfocitelor B. După 6 săptămâni, numărul limfocitelor B crește pentru a depăși semnificativ numărul de limfocite T. Când sunt complet mature, amigdalele cecale sunt de o dimensiune mare, și reprezintă o componentă majoră a TLAMD aviar.Țesutul limfoid al amigdalelor cecale este prezent în partea medială a intestinului. Sunt vizibile lumenul cecal și mai multe cripte în adâncimea țesutului limfoid. Criptele sunt înconjurate de foliculi limfoizi secundari cu regiuni de celule T intercalate. Amigdalele cecale și alte TLAMD, cum ar fi țesutul limfoid cloacal, ar putea juca un rol în diferențierea celulelor stem în limfocite B.

Țesutul limfoid din rect. Rectul aviar este partea dreaptă terminală a intestinului între colon și cloacă. Are o lungime de aproximativ 8 cm la pui. Lamina proprie a mucoasei rectului este puternic infiltrată de celulele limfoide care sunt adesea organizate în foliculi limfoizi mici. Ca atare, este foarte similar cu țesutul limfoid care este prezent în perete al proctodeumului. Acest țesutul limfoid este totuși rar studiat la păsări.

I.3.1. Homeostazia mucoasei și funcția de barieră

Mucoasa servește drept barieră între epiteliul intestinal și conținutul lumenului intestinal reprezentat de conținutul alimentar dar și substanțele nocive și deșeurile conținute în acesta. Acest lucru nu exclude o permeabilitate selectivă pentru anumite componente cu moleculă mică precum nutrienții, gazele etc. Epiteliul intestinal este protejat prin intermediul stratului de mucus de microorganisme comensale prezente în mod normal în lumenul intestinal, precum și de bacteriile sau virusuri patogene. Stratul de mucus intestinal este prima linie de apărare care protejează epiteliul împotriva amenințărilor lumenale. Oferă protecție inclusiv împotriva forțelor mecanice din timpul procesului de digestie. (Duangnumsaeng et al, 2021). Se poate afirma faptul că mucusul oferă protecție nu numai printr-o barieră fizică, ci și prin intermediul AMP-urilor (peptide antimicrobiene) secretate de epitelii în stratul de mucus și legate în interiorul acestuia. Stratul de mucus vâscos este alcătuit din 95% apă și săruri, lipide, carbohidrați și proteine, cum ar fi imunoglobulinele, factorii de creștere și TFF (Trefoil Factor Family). Caracterul vâscos al mucusului este dat de mucinele secretorii. Aceste glicoproteine cu o dimensiune de $1-20 \times 10^6$ daltoni, care sunt secretate în lumenul intestinal de către celulele caliciforme. Grosimea stratului de mucus variază în funcție de segmentul intestinal și de densitatea bacteriană de la nivelul aceluși segment. Epiteliul intestinului subțire este acoperit cu un strat de mucus redus în grosime și parțial discontinuu iar la nivelul colonului și rectului este foarte dens populat bacterian, grosimea mucusului este de până la 155 μm .

Stratul de mucus din stomac și colon este organizat în două straturi, fapt demonstrat de mai multe studii. Stratul exterior de mucus neaderent este mai moale și mai gros datorită unei retenții mai mari de apă și a degradării microbiene. Acesta este colonizat de germeni intestinali, fiind evacuat în mod constant ceea ce asigură un tranzit intestinal bun și eliminarea substanțelor nocive sau a microorganismelor patogene. Stratul intern de mucus aderent este însă foarte dens și aderă ferm la epiteliul intestinal și spre deosebire de stratul extern, acesta este steril și menține flora intestinală departe de epitelii. Acest fenomen a fost observat în intestinul subțire din cauza grosimii mici și a caracterului discontinuu al stratului de mucus. În plus față de mucinele secretorii, epiteliul formează de asemenea și mucine care sunt încorporate în membrana celulară pe partea apicală. Mucinele sunt produse pe diferite suprafețe epiteliale și prezintă o distribuție specifică țesutului. Muc2 este cea mai puternic exprimată mucină structurală a stratului de mucus din colon. Cele mai frecvente mucine legate de membrană din colon includ Muc1, Muc3 și Muc4. Comun tuturor mucinelor, gena conține domeniul VNTR număr variabil de repetări în tandem, un nucleu proteic liniar, care este bogat în aminoacizi prolină,

serină și treonină. Numărul variabil de repetări în tandem este de un număr mare de oligozaharide cu legătură O și care reprezintă până la 85% din masă moleculară. Aceste mucine sunt puternic glicozilate, lucru care conferă mucinelor proprietatea lor hidrodinamică și vâscozitatea ridicată. Prin urmare domeniul VNTR este specific pentru fiecare mucină în ceea ce privește secvența de aminoacizi, numărul de unități de repetiție și într-un final gradul de glicozilare. De asemenea, oligozaharidele unei anumite mucine sunt variabile iar acestea pot fi compuse din 2 până la 20 de monozaharide. Acestea pot fi liniare sau ramificate și pot fi neutre sau purtătoare de sarcină negativă. Unele dintre mucinele secretorii posedă "domenii ale factorului von Willebrand". Aceste mucine cum ar fi Muc2 sunt bogate în cisteină ce contribuie la polimerizare și, astfel, la formarea structurii gelatinoase a mucusului prin formarea de punți disulfurice.

MUC2 prezintă profiluri distincte de expresie spațio-temporală pe parcursul dezvoltării tractului gastrointestinal și conține 64 de exoni iar expresia crește odată cu vârsta și de la anterior la posterior de-a lungul intestinului. S-a observat o organizare similară a domeniilor proteinei de pui cu cea umană. Se remarcă o peptidă semnal și mai multe domenii von Willebrand la extremitatea N-terminală și cu nodul caracteristic de cistină la extremitatea C-terminală. Totuși, domeniul PTS al puiului de găină diferă semnificativ de ortologul uman. Deși domeniul la pui este mai scurt, unitatea repetitivă are o lungime de 69 de AA, ceea ce îl face de 3 ori mai lung decât la om. Totuși compoziția de aminoacizi prezintă foarte puține asemănări cu modelul uman, ceea ce poate contribui la diferențele dintre specii în ceea ce privește răspunsul imunitar înăscut, deoarece glicozilarea de-a lungul acestui domeniu asigură o mare parte din barieră. S-au identificat patru mucine formatoare de gel (Muc6, Muc2, Muc 5ac și Muc 5b) și trei mucine transmembranare (Muc4, Muc13 și Muc16). Mucinele formatoare de gel sunt codificate în cadrul unui locus similar cu mucinele umane coresponzătoare. Se pot identifica și aspecte diferite precum faptul că puiul prezintă o genă suplimentară inserată între Muc2 și Muc5ac care codifică subunitatea α a ovomucinei, o proteină similară cu Muc2, dar căreia îi lipsește un domeniu PTS. De asemenea, se știe că subunitatea β a ovomucinei este ortologul MUC6 umane. Gena transmembranară Muc13 se află la pui, precum și la mamifere, adiacentă genei HEG, gena ce are domenii PTS, EGF (factor de creștere epidermică) și domenii transmembranare ca Muc13, sugerând că aceste două proteine sunt înrudite din punct de vedere evolutiv. Spre deosebire de mucinele cunoscute anterior, domeniul PTS al Muc13 este codificat de mai mulți exoni, unde fiecare exon codifică o unitate de repetiție a domeniului PTS (domeniul se găsește în mai mulți factori de transcripție care se leagă de ADN sau ARN) (Chengwei et al, 2023).

Muc1 ce face parte din categoria mucinelor legate de membrană, cum ar fi un domeniu extracelular care include domeniul VNTR, un domeniu transmembranar hidrofof cu care sunt ancorate în membrana celulară și o parte citoplasmatică.

Mucinele legate de membrană au o varietate de funcții precum protejarea suprafeței celulare de proteoliză și de invadatorii microbieni și influențarea aderențelor celulă-celulă. De asemenea mucinele legate cu domeniul lor extracelular de membrană, pot acționa ca receptori pentru diverși liganzi, de exemplu pentru componente bacteriene, și pot interveni în semnalizarea celulară. S-a descris faptul ca Muc1 este implicat cu domeniul său intracelular lung de 72 de aminoacizi în diverse căi de semnalizare, cum ar fi Wnt, NFkB, MAPK și STAT1.

MUC2 de pui este remarcabil de asemănător cu cel de șoarece și cel uman în afara domeniului PTS central dar este foarte divergent în interiorul acestei structuri repetitive centrale. Sunt bine cunoscute implicațiile fiziologice și asociațiile cu patologia ale MUC pe diverse suprafețe mucoase. Totuși există încă multe întrebări cu privire la modul și motivul pentru care arhitectura genetică a acestei familii contribuie la diverse modificări proteice care prezintă efecte biologice diverse în sănătate sau stări patologice. Expresia genei MUC2 a fost utilizată ca marker pentru sănătatea intestinelor la păsările de curte și la alte specii și de exemplu, Li et al. au constatat că suplimentarea cu Zn în dietele de reproducție a îmbunătățit morfometria, a crescut numărul de celule caliciforme pe vilozități și expresia genei MUC2 și a redus nivelurile de ARNm ale citokinelor proinflamatorii, cum ar fi IL-6 și IL-1 β în jejunul puilor lor. În comparație cu păsările CON expresia genei MUC2 a fost redusă cu 29% la păsările cu bariera intestinală afectată. Se pare ca modelul GBF a redus protecția stratului de mucus în jejun (Chen et al, 2015). Mucoasele care căptușesc tractul gastrointestinal, respirator și genito-urinar sunt expuse permanent unei mari varietăți de microorganisme. Tractul gastrointestinal (TGI) este colonizat de numeroase comunități bacteriene. Acestea sunt diverse și sunt în număr de până la $\sim 10^{14}$ celule microbiene pe gram de conținut colonic reprezentat de ~ 500 -1000 de specii bacteriene. Sistemul imunitar al mucoasei este stimulat să producă Ig A pentru a preveni invazia a microorganismelor patogene și pentru a regla interacțiunile dintre gazdă și bacterii (Merino-Guzmán, 2017).

Se poate afirma ca microbiota comensală generează, de asemenea, costuri pentru gazdă deoarece la nivelul intestinului proximal (pipotă și intestin subțire), microorganismele concurează cu gazda pentru energie și proteine. Atât în intestinul proximal, cât și în cel distal, microbii produc metaboliți toxici (de

exemplu, cataboliți ai aminoacizilor) și catabolizează acizii biliari, ceea ce poate deprima creșterea și, respectiv, reduce digestibilitatea grăsimilor la păsări. Microbiota prezentă la nivel intestinal duce la creșterea secreției de mucină la acest nivel și îmbunătățește rata de reînnoire a celulelor epiteliale. În acest fel se menține lubrifiat tractul gastrointestinal și este împiedicată invadarea celulelor epiteliale intestinale ale gazdei de către microorganisme. De asemenea, sistemul imunitar intestinal este mai dezvoltat și secretă IgA, care se leagă în mod specific de epitopi bacterieni ceea ce ajută la reglarea compoziției bacteriene din intestin. Deși aceste procese sunt benefice pentru organismul păsărilor, ele nu ajută la dezvoltarea corporală din cauza necesităților energetice. Microbiota gastrointestinală poate fi clasificată în continuare în microbiota luminală și microbiota mucoasă. Compoziția microbiotei luminale este determinată de mai mulți factori precum compoziția microbiotei atașate mucoasei ce este influențată de mai mulți factori ai gazdei, cum ar fi expresia unor situsuri de adeziune specifice pe membrana enterocitelor, secreția de imunoglobuline secretorii și rata de producere a mucusului. Compoziția microbiotei luminale mai este influențată și de nutrienții disponibili, de prezența substanțelor antimicrobiene și de rata de trecere a hranei. Microbiota luminală și microbiota asociată la nivelul mucoasei se influențează reciproc. Se poate afirma că dieta poate modifica atât microbiota luminală, cât și pe cea atașată la nivelul mucoasei și într-un final influențează sănătatea intestinală (Shang et al, 2018). SIgA reglează compoziția microbiotei intestinale și joacă un rol important în menținerea relației homeostatice între microbiota intestinală și gazdă (Pietrzak et al, 2020).

Intestinul puilor adăpostește între 10^8 și 10^9 ufc/g de bacterii, care este de obicei dominată de lactobacili însă din cauza diferenței de timp dintre hrănire și prelevare s-au observat variații mari în compoziția microbiană între puii de carne individuali hrăniți cu o dietă similară. La nivelul stomacului muscular concentrația de bacterii este similară cu cea din gușă. Totuși activitatea de fermentație bacteriană este scăzută, în principal din cauza pH-ului scăzut. Majoritatea bacteriilor din pipotă sunt lactobacili, enterococi, enterobacterii lacto-negative și bacterii coliforme. Din cauza timpului scurt de trecere și a diluării conținutului digestiv prin bila secretată densitatea bacteriană cea mai scăzută la nivelul intestinului subțire este în duoden. La puii broiler microbiota intestinală este pe deplin stabilită și stabilă până la vârsta de 2-3 săptămâni. Studiile au demonstrat că dieta joacă un rol semnificativ în determinarea ecologiei microbiene a intestinului la păsări.

Interacțiunea dintre compoziția alimentară și microorganismele intestinale reglează dezvoltarea intestinală, arhitectura mucoasei și compoziția mucusului

intestinal. S-a demonstrat prin experimente efectuate pe păsări hrănite influența asupra populației și activității microbiene intestinale a diferitelor componente alimentare, precum componentele fibroase și aditivii furajeri precum antibioticele, prebioticele, probioticele și enzimele (Gamage et al, 2015).

Comunitatea bacteriană duodenală este formată în principal din clostridii, streptococi, enterobacterii și lactobacili însă dintre segmentele intestinului subțire microbiota ileonului a fost cel mai mult studiată.

S-a constatat că *Lactobacillus* reprezintă grupul majoritar (70%), urmat de membrii familiei Clostridiaceae (11%), *Streptococcus* (6,5%) și *Enterococcus* (6,5%). Comparativ cu ileonul, cecumul adăpostește o comunitate microbiană mai diversă, mai bogată și mai stabilă, inclusiv anaerobi. Din ziua ecloziunii până la vârsta de 6 săptămâni Oakley et al. au documentat schimbări semnificative în comunitățile microbiene cecale la puii de carne comerciali. De asemenea, diferențe semnificative s-au remarcat între probele cecale și cele fecale de la un singur individ. În mod obișnuit, bogăția și diversitatea bacteriană la nivelul cecumului cresc în aceste 6 săptămâni, iar compoziția taxonomică a comunității se schimbă rapid de la Proteobacteria, Bacteroides și Firmicutes, la aproape toate Firmicutes până la vârsta de 3 săptămâni. Cu toate acestea, Kumar et al. au constatat că Firmicutes au fost cele mai abundente filoane atât în cecum, cât și în ileon, la toate vârstele (de la ziua 0 la ziua 42), cu excepția zilei 42 în cecum unde Bacteroidetes erau abundente (Shang et al, 2018).

I.3.2. Răspunsul imunitar la nivelul intestinului la păsări

Sistemul imunitar al organismelor superioare cuprinde sistemul imunitar înăscut și sistemul imunitar adaptativ. Apărarea primară împotriva microorganismelor în prima fază a infecției se realizează de către sistemul imunitar care s-a dezvoltat foarte devreme în filogenie și anume sistemul imunitar înăscut. Reacția de apărare fiind nespecifică antigenului permite o apărare foarte rapidă împotriva unei game largi de microorganisme. La atingerea unui anumit prag de infecție, se mobilizează sistemul imunitar adaptativ, care se bazează pe un răspuns specific antigenului al limfocitelor T și B și este direcționat împotriva epitopilor specifici ai structurilor microbiene. Microorganismele sunt recunoscute de către sistemul imunitar înăscut prin intermediul unor receptori specifici codificați în genom, PRRs (pattern recognition receptors), care se leagă de anumite componente microbiene, PAMPs (pathogen associated molecular patterns) sau MAMPs (microbe associated molecular patterns). Pattern recognition receptors se găsesc atât în celulele imune, cât și în celulele epiteliale și pot fi intracelulare, cum ar fi

receptorii de tip NOD, numiți și NLR-uri (NOD înseamnă "nucleotide binding oligomerization domain"), sau legate de membrană, cum ar fi TLR-urile (toll like receptors).

Și la nivel intestinal funcționează atât sistemul imunitar înăscut, cât și cel umoral. Sistemul imunitar înăscut are și rolul de a produce peptide antimicrobiene și se poate menționa faptul că în intestinul subțire al puiului a fost raportată o expresie marcată a β -defensinelor antimicrobiene AvBD8, AvBD10 și AvBD13. De asemenea la nivelul jejunului, există o expresie crescută a citokinei TNFSF15 la puii cu enterită necrotică. La provocarea cu SE s-au observat creșteri ale numărului de celule B care exprimă IgM sau IgG în placile Peyer ale puilor. În ileon sunt exprimate receptorul Toll like 2b (TLR2b; un receptor care recunoaște tiparele lipoproteinelor bacteriene) și IL-6 (o citokină proinflamatorie).

La păsări au fost identificați ca și la mamifere numeroși receptori de recunoaștere a modelelor de detectare a virusurilor (PRR), inclusiv receptori de tip Toll (TLR) și receptori de tip RIG-I (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) (RLR). Trebuie menționat faptul că TLR aviare sunt ușor diferiți de omologii lor de la mamifere, inclusiv pseudogena TLR8, absența TLR9 și prezența TLR1La, TLR1Lb, TLR15 și TLR21. TLR3 și TLR7 aviară sunt implicate în recunoașterea virusurilor ARN, în special a virusului gripei aviare înalt patogene (HPAIV). TLR15 și TLR21 sunt potențiali senzori care recunosc atât virusurile ARN, cât și bacteriile însă totuși, agonistul TLR15 este încă necunoscut. În semnalarea receptorilor TLR au fost identificate două căi intracelulare predominante ale TLR: calea dependentă de MyD88 și calea dependentă de TRIF. Calea dependentă de MyD88 utilizează molecula adaptore MyD88 și conduce la o reacție timpurie de activare timpurie a NF- κ B, care duce la transcrierea genelor proinflamatorii, cum ar fi IL-1, TNF- α , IL-6 și IL-8 din monocite, macrofage și celule dendritice și endoteliale.

A doua cale semnalează prin intermediul Toll-IL-1R și induce IFN- β și produce citokine precum IFN- β . De asemenea, această cale se poate activa prin intermediul NF- κ B într-un mod întârziat și duce la producerea de TNF și alte citokine inflamatorii. Toate TLR-urile, semnalizează exclusiv prin intermediul căii MyD88-dependente de către MyD88. TLR4 activează ambele căi, în timp ce TLR3 identifică dsRNA viral și induce citokine inflamatorii, cum ar fi TNF și IL-6, exclusiv prin calea independentă de MyD88. Excepție fac TLR3 și TLR4, care nu semnalizează exclusiv prin intermediul căii MyD88-dependente de către MyD88. Citokinele produse atât pe aceste căi, conduc la activarea imunitară declanșează căi secundare care alarmează gazda cu privire la agenții patogeni invadatori.

Spre deosebire de rațe, găște, este interesant faptul ca găinile nu au RIG-I, însă ele exprimă gena 5 asociată diferențierii melanomului (MDA5), care compensează funcțional absența RIG-I.

De asemenea transcriptele MDA5 sunt prezente la pui și compensează funcțional absența RIG-I. Expresia IFN de tip I depinde de MDA5 și, respectiv, de RIG-I în cazul infecției cu virusul înalt patogen al gripei aviare (HPAIV) la găini și rațe. Expresia de IFN- β în cazul infecției cu gripă este reglată în principal de RIG-I (gena I indusă de acidul retinoic), ceea ce duce la exprimarea genelor antivirale stimulate de IFN în aval, lucru ce poate explica sensibilitatea diferită la HPAIV H5N1 a puilor și păsărilor. Unicul membru al familiei NLR (domeniu de legare a nucleotidelor care conține repetări bogate în leucină) care a fost identificat la păsări, se pare că este implicat în răspunsul imunitar antiviral al gazdei se pare ca este NLRC5 dar mai este încă mult până la o înțelegere completă a mecanismului de recunoaștere virală și a răspunsului antiviral al gazdei cu toate că la păsări au fost identificate unele PRR de detectare virală și PAMP-urile (Model molecular asociat patogenilor) virale cunoscute de acestea în special la păsările de apă. Trebuie menționat faptul ca ontogenia și localizarea celulară a PRR aviare nu au fost încă confirmate si nu se cunoaste încă dacă alte PRR care sunt absente la mamifere sunt prezente la păsări. Mai mult, trebuie, de asemenea, elucidate numeroase molecule de semnalizare și căi de semnalizare în aval activate de diverse PRR și interacțiunea dintre ele. Cele mai studiate PRR-uri sunt TLR-urile care sunt glicoproteine transmembranare de tip I constând într-un domeniu extracelular N-terminal care are repetări bogate în leucină (LRR) și una sau 2 regiuni bogate în cisteină, un domeniu transmembrantar și un domeniu intracelular conservat Toll/interleukina-1 receptor (TIR).

La mamifere și păsări au fost descrise diferite tipuri de TLR. Conform literaturii de specialitate, o clasă largă de macromolecule acționează ca liganzi TLR. De asemenea proteine, lipide și acizi nucleici, cum ar fi lipopolizaharida (LPS), acizii lipoteichoici, lipoproteinele, peptidoglicanii, zymosanul, flagelina, ARNdS și ARNdS nemetilati pot acționa ca și liganzi TLR. TLR-urile sunt importante în identificarea și discriminarea componentelor microbiene distincte. Cele mai studiate TLR-uri până în prezent au fost TLR2 și TLR4. TLR2 semnalează prezența lipopeptidelor de la bacterii Gram pozitive sau molecule de pe peretele celular al bacteriilor și drojdiilor, în timp ce TLR4 este principalul semnal de receptor pentru lipopolizaharidele de la bacteriile Gram-negative. Domeniul LRR recunoaște PAMP-urile și activează proteinele transmițătoare de semnal care inițiază o cascadă de semnale. Există o incertitudine a faptului că

aceste căi de transducție a semnalelor induse de PRR au ca rezultat sinteza unei largi game de molecule, inclusiv citokine și chemokine.

Toleranța este un proces complex care implică acțiunea coordonată atât a celulelor imune, cât și a celor neimune, la nivelul mucoasei iar rolul cheie al sistemului imunitar intestinal este acela de a asigura toleranță orală la antigeni alimentari și la microbiota comensală, păstrând în același timp activitatea de protecție împotriva agenților patogeni (Bernadeta et al, 2020).

Pe lângă răspunsul imunitar, cascada de semnalizare NFkB este implicată în mod semnificativ în funcțiile de barieră intestinală și în procese precum proliferarea, diferențierea și apoptoza. Familia NFkB include cinci factori de transcripție (RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 și p52) care se leagă ca homo- sau heterodimeri la un motiv ADN specific. În starea nestimulată, dimerii NFkB nu pot migra în nucleul celular pentru ca sunt legați de proteinele kB inhibitoare (IkB) din citoplasmă. Reprezentarea schematică a cascadei canonice de semnalizare NFkB. Activarea sistemului imunitar înăscut duce la o cascadă de mecanisme de protecție, inclusiv la producerea de diverși factori imunomodulatori, cum ar fi citokinele, care inițiază apoi răspunsul imunitar adaptativ, printre altele. Expresia factorilor de apărare este indusă ca răspuns de protecție împotriva agenților patogeni (peptidele antimicrobiene și mucinele, principalele componente ale stratului de mucus).

Peptidele antimicrobiene (AMP) reprezintă antibiotice endogene cu un spectru larg de activitate antimicrobiană împotriva virusurilor, bacteriilor, ciupercilor și protozoarelor iar AMP-urile cunoscute includ diverse defensine, catelicidina LL-37, lizozim și antiproteaze antimicrobiene. Până în prezent au fost descoperite câteva sute de AMP-uri. Indiferent de originea, spectrul de acțiune și structura lor, AMP-urile au în cea mai mare parte următoarele caracteristici: sunt formate din maximum 60 aminoacizi, sunt încărcate pozitiv și au un caracter amfipatic.

Una dintre cele mai importante grupe de AMP din tractul gastrointestinal include defensinele, care sunt împărțite în α - și β -defensine în funcție de modelul punților disulfură și de structura lor terțiară. α -defensinele se găsesc în leucocitele neutrofile și în celulele granulelor Paneth din intestinul subțire. Singurele defensine exprimate la speciile aviare sunt Beta-defensinele, care sunt exprimate în celulele epiteliale ale intestinului subțire și gros, dar se găsesc și în alte țesuturi.

Beta-defensine la pui se mai numesc și gallinacine. În total, în genomul găinilor au fost identificate 14 β -defensine diferite. Aceste gene sunt denumite beta-defensine aviare (AvBD) 1-14. Există o expresie ridicată a ARNm al β -defensinei în ziua ecloziunii, de-a lungul întregului intestin și este ulterior

diminuată în prima săptămână de după ecloziune. De asemenea s-a observat că infecția cu bacterii sau cu componentele acestora induce expresia genelor AvBD la pui. Mecanismele de acțiune antimicrobiană nu sunt încă pe deplin înțelese iar un posibil mecanism este descris în așa-numitul "model Shai-Matsuzaki-Huang", model care se bazează pe sarcina pozitivă, care permite AMP-urilor să se insereze în membrana bacteriană încărcată negativ și să o distrugă prin formarea de pori (Ying Luo et al, 2021). Unele dintre defensine sunt exprimate în mod constitutiv, cum ar fi HD5 și -6 în celulele granulare Paneth sau HBD1 în epiteliul colonului. Pe de altă parte alte defensine, cum ar fi HBD2, sunt induse de componente microbiene sau endogene specifice în caz de infecție având rolul de a întări barierele de apărare. Numeroase AMP au și alte funcții pe lângă efectul lor antibiotic, cum ar fi faptul ca unii AMP declanșează migrația chemotactică a celulelor imune sau stimulează expresia factorilor de transcripție, a integrinelor, a chemokinelor, precum și a receptorilor acestora. De asemenea, anumite AMP neutralizează factorii endogeni și microbieni dăunători. În timpul inflamației, proteazele sunt eliberate în cantități mari având rolul de apărare împotriva agenților patogeni și permit, de asemenea, leucocitelor să migreze prin matricea extracelulară. Cu toate acestea, ele pot provoca, de asemenea, distrugerea țesuturilor. Prin urmare, antiproteaze precum SLPI (Inhibitor de peptidază leucocitară secretorie) sunt exprimate pentru a contracara efectele proteazelor agresive (Robinson et al, 2015).

Dezvoltarea sistemului imunitar poate fi stimulată de către microbiota comensală și chiar și de către stratul de mucus, monostratul epitelial, celulele imunitare intestinale (de exemplu, celulele T citotoxice și helper, celulele producătoare de imunoglobulină și celulele fagocitare) și a lamina propria. Aceste țesuturi construiesc bariere între gazdă și microbi și combat microorganismele intestinale nedorite (Shang et al, 2018). Bunker et al. au observat că majoritatea microbiotei comensale care se găsește în intestinul subțire induce producția de IgA, în timp ce majoritatea speciilor indigene din colon nu determină astfel de răspunsuri. De asemenea s-a constatat că aproape toți taxonii acoperiți cu IgA din colon au fost prezenți și în intestinul subțire. Aceste date sugerează că răspunsurile IgA vizează în mod preponderent bacteriile comensale din intestinul subțire. Taxonii acoperiți cu IgA din colon reprezintă populația provenită din intestinul subțire. Trebuie menționat faptul că cecumul exprimă la puii hrăniți cu mici peptide cationice produse de o bacterie Gram-pozitivă din sol, *Brevibacillus texasporus* și provocați cu citokine proinflamatorii o expresie cecală crescută a citokinelor proinflamatorii (interleukina 1 β [IL-1 β], IL-6, IL-18, IFN de tip I și II) și a chemokinei inflamatorii - CXCLi2. Amigdalele cecale sunt situate în

apropierea joncțiunii ileo-cecale și conțin celule B care exprimă IgM sau IgG sau IgA. De asemenea în cecum sunt exprimate receptorul Toll like 2b (TLR2b) și IL-6.

Stratul de mucus care captează epiteliul intestinal reprezintă o componentă majoră a barierei intestinale. Acesta are două funcții esențiale în tractul gastrointestinal: pe de o parte, mucusul umezește suprafața intestinală și facilitează astfel trecerea conținutului intestinal (Pietrzak et al, 2020).

În aceste zone imunitare ale mucoaselor sunt prezente 80% din limfocite, de aceea sunt cunoscute sub numele de țesuturi limfoide asociate mucoaselor (TLAM). Fiind parte a sistemului imunitar umoral adaptativ, plasmocitele produc cantități mari de imunoglobulină A secretorie (SIgA) care este cea mai importantă imunoglobulină din secreții (Merino-Guzmán et al, 2017). Imunoglobulinele prezintă două lanțuri ușoare și două lanțuri grele în alcătuirea lor. Lanțurile grele diferă de la o clasă la alta și au o regiune Fc care mediază funcțiile biologice cum ar fi capacitatea de legare la receptorii celulari și o regiune Fab care conține situsuri de legare a antigenului. Lanțurile sunt pliate în regiuni ce poartă numele de domenii. Se pot identifica 4 sau 5 domenii în lanțul greu, în funcție de clasa lor, și două domenii în lanțul ușor.

Diferențele între domeniile constante Fc permit o clasificare a imunoglobulinei în cinci izotipuri: IgG, IgA, IgM, IgE și IgD. Spre deosebire de mamifere, păsările nu sunt capabile să genereze noi molecule receptoare de anticorpi pe parcursul întregii vieți. Până acum, doar trei clase de imunoglobuline (Ig)-IgM, IgY și IgA- au fost identificate la găini, și toate diferă de structura celor omoloage la mamifere. IgM Aviară este, funcțional, similară cu cea a mamiferelor și este, similar, anticorpul predominant în timpul răspunsului secundar în infecție, dar nu conține nici unul dintre subtipurile ce sunt prezente la mamifere. IgA se găsește în mucus și secreții. Până acum, IgE și IgD nu au fost observate și descrise în cazul păsărilor, dar IgY prezintă o serie de proprietăți comune cu Ig E de la mamifere. IgA secretorie (SIgA) este clasa de anticorpi dominantă în secrețiile mucoaselor iar majoritatea plasmocitelor producătoare de IgA sunt localizate în interiorul mucoasei intestinale. SIgA protejează împotriva aderării agenților patogeni și a pătrunderii acestora în bariera intestinală. De asemenea, SIgA reglează compoziția microbiotei intestinale și asigură homeostazia intestinală (Pietrzak et al, 2020).

Majoritatea IgA din secreții aveau o structură moleculară de tetramer de IgA de tip seric, având 600.000-700.000 daltoni. Pe de altă parte, IgA din secreția intestinală a prezentat o strânsă asemănare cu SIgA de mamifere, având 350.000

daltoni. Prezența activității anticorpilor în IgA intestinale față de reovirusurile aviare a fost confirmată prin teste (Watanabe et al, 1975).

Speciile de vertebrate utilizează IgA produsă de plasmocitele B ca principală apărare dobândită neutralizând toxinele și patogenii ((Merino-Guzmán et al, 2017).

I.3.3. Mecanisme de protecție ale mucoasei intestinale la păsări

Pentru a lupta eficient împotriva infecțiilor, organismul a dezvoltat mecanisme de protecție, unul dintre acestea fiind mucoasa gastrică și intestinală. Absorbția lichidelor și a nutrienților are loc prin bariera intestinală la nivelul celulele epiteliale prin intermediul unui "strat limită fin reglementat". Acest lucru necesită o permeabilitate ridicată a mucoasei pentru aceste molecule. În același timp, se va realiza barieră care protejează organismul împotriva pătrunderii unor substanțe străine toxice (de exemplu, microorganisme sau antigeni) și previne o pierdere nedorită de apă și electroliți (Hoffmann et al, 2009). Mucoasa intestinală este o barieră selectivă și trebuie înțeleasă ca o structură dinamică care interacționează și poate reacționa la diverși stimuli. Un factor major pentru menținerea barierei intestinale este sistemul imunitar asociat mucoasei intestinului, care recunoaște și selectează substanțele luminaie (Latek et al, 2022)

Pentru a induce boli gastrointestinale, agentul patogen trebuie să depășească stratul mucoasei, pentru care a dezvoltat strategii speciale. În acest strat se află agenți comensali și substanțe de apărare, cum ar fi enzimele, care sunt instrumente împotriva agenților patogeni. Substanțele de apărare includ glicoproteinele, cum ar fi mucinele, enzimele digestive, peptidele antimicrobiene și imunoglobulinele. Unele proteine, cum ar fi -defensinele sau imunoglobulina A (IgA), sunt exprimate permanent sau induse.

Prin degradarea bacteriană a carbohidraților în acizi grași cu lanț scurt (butirat, acetat sau propionat), furnizează, de asemenea, stratului epitelial intestinal substraturi pentru producerea de energie (Hachung et al, 2012). Structurile antigenice ale microbiotei au un efect imunomodulator, deoarece interacționează cu TLAMD.

Un alt mod prin care tractul gastrointestinal se protejează de agenții patogeni este propria microbiotă. Modificări ale microbiotei sunt asociate cu mai multe boli a căror fiziopatologie se bazează, de asemenea, pe o funcție de barieră alterată. Pe de o parte, microbiota este implicată în reglarea sistemului imunitar al gazdei și, pe de altă parte, în activarea metabolismului epitelial (Kelly et al, 2015). Pe scurt, se poate afirma că sistemul de apărare fin reglementat al barierei

intestinale este influențat de o varietate de factori și este rezultatul unei interacțiuni între mucoasă, microbiota și sistemul imunitar intestinal (Hoffmann et al, 2009).

I.4. Antioxidanți naturali utilizați ca suplimente nutritive în hrana păsărilor

I.4.1. Turmericul (*Curcuma longa*) – structură chimică, proprietăți

Curcumina (diferuloilmetan), un polifenol natural, este principiul activ al turmericului (*Curcuma longa*). Aceasta a fost un condiment popular în bucătăriile din Asia și Orientul Mijlociu de secole (Rajput et al, 2013). Turmericul conține o componentă activă numită curcumină (WuthiUdomler et al., 2000 și Mashhadani, 2015) ce variază între 2 și 5%. Conținutul de curcumină din varietatea locală de turmeric de Assam a fost estimată și dovedită ca fiind 3,00% din greutatea uscată. Curcumina și curcuminoizii sunt prezenți în turmeric în jurul valorii de 22,21-40,36 mg / g la rizomi și 1,94 mg / g în rădăcinile tubercule, astfel încât turmericul este mai puțin puternic ca atare decât ca extract. Aceasta are o structură conjugată unică, incluzând doi fenoli metoxilați și o formă enol de β -dietonă iar structura sa prezintă o activitate tipică de capcană radicală „ca un antioxidant de rupere a lanțului” (Choudhury et al, 2019).

Mai mulți autori au scris despre compoziția rizomului de turmeric.

Ikpeama et al. (2014) au raportat că turmericul conține 8,92% umiditate, 2,85% cenușă, 4,60% fibre brute, 6,85% grăsimi, 9,40% proteine brute și 67,38% iar un alt raport a concluzionat ca în compoziția turmericului pot fi identificați carbohidrați în proporție de 67,91% un conținut scăzut de grăsimi (2,46%), fibre (4,02%) și proteine (9,34%).

Conținutul de fibre în proporție de 4,60% ne arată contribuția turmericului la menținerea unei digestii sănătoase și a integrității tractului digestiv al păsărilor în dieta cărora adăugăm pulbere de turmeric. Chattopadhyay et al. (2004) au raportat 6,3% proteine, 5,1% grăsimi, 3,5% minerale, 69,4% carbohidrați și 13,1% umiditate. De asemenea, se observă că turmericul este bogat în minerale și vitamine (Olumuyiwa et al, 2018). Turmericul a fost raportat pentru a efectua o serie de activități biologice cum ar fi antiinflamatorii, antioxidante, antimicrobiene (Araujo și Leon, 2001), anticoagulante, antidiabetice și antiulceroase. Din rapoartele disponibile, pe lângă faptul că turmericul ar putea fi o veritabilă sursă de proteine și carbohidrați, îmbunătățiri înregistrate asupra creșterii și performanței de producție la păsările hrănite suplimentar cu turmeric ar putea fi atribuite proprietăților benefice ale acestuia. Beneficiile sale în nutriția pasărilor includ îmbunătățirea parametrilor de performanță, secreția enzimelor digestive și activarea răspunsurilor imune și a activităților antimicrobiene și antioxidante. Alte

functii constau in: îmbunătățirea mai multor indicatori hematologici și biochimici, creșterea titrului de anticorpi după vaccinare, diminuarea stresului cauzat de căldura prin diferite mecanisme, creșterea activității antioxidante, scăderea numărului de bacterii potențial patogene, adică *Escherichia coli*, în conținutul ileal la găinile ouătoare.

Datorită proprietăților medicinale ale turmericului, utilizarea acestuia în hrana pasărilor a devenit extinsă în ultimul deceniu.

Suplimentarea de turmeric în furajul pasărilor nu produce niciun efect dăunător asupra acestora și nici asupra consumatorilor, în cele din urmă, conducând chiar la o mai bună rentabilitate pentru agricultori.

Activitatea antioxidantă oferă o speranță mare ca soluție pentru stresul termic la păsările de curte. Polifenolii sunt prezenți într-o varietate de plante și au fost folosiți în diverse scopuri, datorită capacității lor puternice antioxidante. Stresul termic este împărțit în stres termic acut și stres termic cronic, cu participarea diferitelor enzime antioxidante. Sub stres termic acut, nivelul ROS în organism crește rapid și sistemul enzimatic antioxidant răspunde, de asemenea, rapid, prin activitatea crescută a CAT, SOD și GSH-Px pentru a elimina radicalii liberi în exces. Cu toate acestea, stresul termic cronic poate „sparge” sistemul enzimatic antioxidant și poate determina acumularea de ROS în organism și induce stres oxidativ prin scăderea activității CAT, SOD și GSH-Px.

Turmericul poate restabili performanța de creștere afectată de stresul, posibil datorită capacității sale de a atenua disfuncția mitocondrială a organismului și de a spori biogeneza mitocondrială cauzată de stresul termic. Zhang și colab. a raportat că turmericul a scăzut producția ROS de după stresul termic prin creșterea activității Mn-SOD mitocondriale și a expresiei genice a tioredoxinei 2 și a peroxiredoxinei-3 (Ruizhi, 2019). În alte studii s-a demonstrat activitatea antioxidantă puternică a curcuminoidelor, care a fost evaluată atât în testele *in vitro* cât și *in vivo*.

Activitatea antioxidantă a turmericului este legată de prezența grupelor fenolice în moleculă. În studiile *in vivo* s-a arătat faptul că turmericul inhibă, de asemenea, metabolismul acidului arahidonic și inflamația prin reducerea căilor ciclooxigenazei și lipoxigenazei. Radicalii liberi induc leziuni oxidative ale macromoleculelor, celulelor și țesuturilor care duc în consecință la o morbiditate crescută și la o creștere a ratei mortalității, cu pierderi economice substanțiale (Huang et al, 1991). Rapoartele au sugerat că turmericul neutralizează radicalii superoxid.

Investigația a raportat o creștere semnificativă a concentrației de catalază (CAT) și superoxid dismutază (SOD) atunci când dieta de bază a puilor carne a

fost suplimentată cu 0,3 și 0,6 g/kg pulbere de turmeric. De asemenea, unii cercetători au arătat că activitatea antioxidantă totală și concentrațiile de SOD s-au îmbunătățit cu adăugarea a 0,5% de pulbere de turmeric în dietă. Curcumina duce la creșterea statusului antioxidant în special prin intermediul SOD, ceea ce s-ar putea datora creșterii expresiei genei SOD la puii hrăniți cu turmeric (Puvača et al, 2018). Turmericul ar putea atenua nivelul factorului de necroză tumorală- α (TNF- α) și al acizilor grași liberi din plasmă (FFA). În plus, inhibă activarea factorului nuclear-kappa B (NF- κ B) și a carbonilului proteic. De asemenea inhibă peroxidarea lipidică și activitățile enzimelor lizozomiale (N-acetil- β -d-glucosaminidază, β -d-glucuronidază, β -d-galactosidază).

În al treilea rând, turmericul este implicat în activarea funcției factorului nuclear legat de factorul eritroid-2 (Nrf2) (Zhang et al, 2013). Gowda și colab. (2009) a constatat că 444 mg curcumină / kg a redus semnificativ concentrația serică de glucoză, în timp ce activitățile enzimelor GGT și AST nu diferă în mod semnificativ în serul puilor broiler alimentați cu curcumină, comparativ cu păsările martor. Acest efect se datora unei utilizări mai bune a glucozei. Este posibil ca pulberea de turmeric să crească activitatea transportorilor de glucoză, care sunt o familie de proteine transmembranare care ajută la transportarea glucozei prin plasmalema (Nisarani et al, 2019).

1.4.1.1. Rolul antiinflamator

Agenții patogeni precum virusurile, bacteriile, fungii și alți stimuli de mediu sunt factori de stres latenți care pot deteriora țesuturile și celulele animale. Lipsa de antioxidanți suficienți pentru a elimina ROS va duce la deteriorarea oxidativă și la declanșarea inflamației. Când apare inflamația, celulele trebuie să recruteze alte celule pe site-urile locale, secretând mai multe citokine și chemokine inflamatorii; acesta este un proces necesar pentru ca gazda să lupte împotriva infecției și să repare țesutul. Cu toate acestea, inflamația prelungită poate duce la cheltuieli inutile de energie. Ca atare, atenuarea și prevenirea suprainflamării și revenirea stării imune la starea normală vor beneficia de producția animalelor. Mulți autori au subliniat că fitogenele din dieta animalelor au îmbunătățit răspunsul imun și capacitatea de protecție a tractusului gastro-intestinal împotriva stresorilor exogeni. Citokinele pro-inflamatorii, ROS și mitogenele generate de infecția bacteriană sau virală, deteriorarea țesuturilor chimic și biologic sau de alți stresori induc activarea semnalizării NF κ B, urmată de exprimarea mai multor citokine și chemokine inflamatorii. Aceste citokine mediază schimbările metabolice, care sporesc răspunsul imun și rezistența la boli, scăzând astfel performanțele de

creștere. TNF-a poate fi secretat de macrofage activate și poate duce la chimiotaxia monocitelor.

Lubbad și colab. au raportat că ar putea suprima inflamația prin reducerea nivelurilor de proteine ale TLR4, MyD88 și NFκB. La păsările de curte, expresia mRNA a IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18 și superfamilia 15 a factorului de necroză tumorală au fost îmbunătățite în macrofagele pulilor tratați in vitro cu extract organic de turmeric.

Rezultatele hibridizării microarray au demonstrat că expresia genică a mieloperoxidazei, grupul de diferențiere 28 și lactotransferina ce sunt asociate cu răspunsul inflamator la pui, a fost reglată în jos prin tratamentul cu extract organic de turmeric (Huang et al, 2018).

1.4.1.2. Rolul coccidiostatic al turmericului

Utilizarea pe scară largă a anticoccidiienilor în sectorul avicol industriei avicole poate duce la apariția de reziduuri de medicamente în carne și în ouă. Ca atare, interesul consumatorilor pentru alimentele ecologice a crescut rapid în ultimii ani (Onyeachonam et al, 2020). Cercetările au găsit efectul coccidiostatic maxim al turmericului atunci când este adăugat în proporție de 3% în dietă în comparație cu alte grupuri infectate ce primesc rații cu un coccidiostatic (Tamam et al, 2010). Rapoartele au arătat că eliminarea oocistilor în fecalele păsărilor infectate experimental cu *E. acervulina* a fost redusă semnificativ atunci când puii de carne au fost hrăniți cu o dietă ce conține turmeric. Diferite cercetări au subliniat capacitatea curcuminei (diferuloilmetan) de a ucide stadii celulare suplimentare de *E. tenella*. Acest fapt s-ar putea datora capacității sale citotoxice care afectează morfologia parazitului și viabilitatea sa. Studiile au propus ideea ca activitatea anticoccidială a turmericului se datorează proprietăților sale antioxidante. Rezultatele studiilor au raportat că scorurile leziunilor intestinului subțire induse de *Eimeria maxima* au fost reduse la puii de carne hrăniți cu 1% turmeric în dietă în timpul infecției.

Diferite cercetări au sugerat că abilitatea curcuminei (diferuloilmetan) de a distruge stadiile extracelulare ale *E. tenella* ar putea fi datorată daunelor citotoxice pe care le produce, afectând viabilitatea, morfologia și, prin urmare, activitatea parazitului. Studiile au subliniat încă o dată ca activitatea anticoccidiană a turmericului se datorează proprietăților sale antioxidante (Puvača et al, 2018). Într-un al studiu s-a observat ca pasta de turmeric a fost eficientă în controlul coccidiozei la pui mai mult decât pulberea de turmeric și poate fi utilizată cu succes ca anticoccidiologic natural și oferă efecte mai bune la 1g/kg de greutate corporală (Onyeachonam et al, 2020).

I.4.1.3. Efectele antivirale

Virusul gripal A (IAV) a provocat trei pandemii în secolul XX. În 1997, o tulpină extrem de patogenă, H5N1, a apărut în Hong Kong. Pentru prima dată, gripa aviară a atras atenția în întreaga lume asupra acesteia, din cauza focarelor devastatoare la păsările de curte și a infecțiilor umane sporadice cu o rată ridicată de mortalitate. Focarele de H5N1 aviare reprezintă un risc pentru sănătatea publică de proporții potențial pandemice.

Recent, mai multe rapoarte au demonstrat că inhibitorii NF-kB au blocat în mod eficient propagarea gripei, sugerând că modularea semnalizării NF-kB poate fi o țintă pentru intervenția antigripală. Curcumina este un inhibitor puternic al semnalizării NF-kB și, prin urmare, poate avea un impact asupra propagării VIA. Cu un profil de siguranță stabilit și o valoare SI ridicată de 92,5, curcumina are un potențial promițător pentru a fi folosit ca medicament antiviral (Piyush et al, 2023). Alte cercetări anterioare au arătat că tratamentul cu curcumină înainte și după pătrunderea virusului va afecta infecțiozitatea virală. Practic, mecanismul de acțiune posibil al curcuminei are legătură cu legarea particulelor virale de receptorii de acid sialic de pe suprafața celulară. Pentru certitudine, s-au efectuat teste de inhibare a hemaglutinării. Curcumina a fost capabilă să inhibe hemaglutinarea de către virusul gripei aviare. Rezultatele obținute arată că curcumina împiedică legarea virusului PR8 de globulele roșii ale puiului, ceea ce este indicat printr-un aspect asemănător cu cel al unui punct în celulele nehemaglutinate. Interesant este faptul că acestab previne, de asemenea, asocierea altor subtipuri de virusuri ale gripei aviare (tulpini H6N1) la globulele roșii (Widhowati, 2017). Boala de Newcastle (ND) este o boală infecțioasă gravă și distructivă a păsărilor. Este considerată o problemă majoră cu care se confruntă cei care cresc păsări de curte în întreaga lume, la scară mare sau mică.

Puii care au fost infectați fără tratament cu *Curcuma longa* au prezentat o rată de protecție mai mică (8%). Puii infectați și apoi tratați cu 1% *Curcuma longa* ca doză de tratament au prezentat o protecție (65%), iar puii infectați și apoi tratați cu 0,5% *Curcuma longa* au prezentat o protecție (40%), în timp ce puii infectați și netratați au prezentat cea mai scăzută protecție (8%), întrucât 92% dintre puii infectați au murit. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele ale lui (Sebla et al., 2007) care au constatat inhibarea virusul herpes simplex de către curcumină (Zahid et al, 2010).

I.4.1.4. Rolul turmericului în substituirea antibioticelor

Antibioticele sunt utilizate de mai multe decenii în industria avicolă pentru a îmbunătăți performanța creșterii, a spori producția și a proteja păsările de agenții patogeni.

Câștigul în greutate corporală a puilor pentru carne în a căror dietă se adaugă antibiotice a fost cu 5,8 % în plus iar acest rezultat a fost explicat prin faptul ca apetitul a fost îmbunătățit. De asemenea s-a observat și creșterea eficienței de conversie a hranei, stimularea sistemului imunitar și creșterea vitalității și reglarea microflorei intestinale.

Antibioticele sunt, de asemenea, importante pentru combaterea patologiilor infecțioase cum ar fi enterita necrotică și coccidioza. Antibioticele sunt utilizate în tratamente fitosanitare, aditivi pentru hrana animalelor și tratamente profilactice la animale și la om.

Utilizarea nejudicioasă a antibioticelor în zootehnie de-a lungul timpului a dus la creșterea rezistenței bacteriene la antibiotice, ceea ce reprezintă o amenințare pentru sănătatea publică. De asemenea nu sunt de neglijat reziduurile din produsele de origine animală și poluarea mediului.

Prin urmare, utilizarea antibioticelor ca promotori de creștere a fost interzisă de Uniunea Europeană în 2006 și de China în 2020 (Habtamu et al, 2022).

Alternativele disponibile pentru înlocuirea antibioticelor se numesc aditivi fitogenici pentru hrana și includ prebiotice, probiotice, enzime, acizi organici și uleiuri esențiale.

Avantajele inerente comparativ cu antibioticele sintetice sau produsele chimice anorganice sunt acelea ca sunt naturale, mai puțin toxice și si nu lasa reziduuri. Aceste caracteristici le fac pe bună dreptate aditivii furajeri ideali în producția animalieră.

Curcuma (*Curcuma longa* Linn.) este una dintre numeroasele plante medicinale care promit produse agricole promițătoare ca aditivi naturali pentru hrana păsărilor de curte. Este sursa principală de compuși fenolici, cum ar fi curcumină, bisdemetoxicurcumină, demethoxicurcumină și tetrahidrocurcuminoide. Mai multe studii privind utilizarea de turmeric la păsările de curte au fost efectuate prin metode in vitro și in vivo și s-a constatat că turmericul și derivații săi au proprietăți antimicrobiene (Lagua et al, 2021).

Sporirea capacității totale antioxidante la puii de carne duce la reducerea stresului oxidativ și a inflamației cu îmbunătățirea digestibilității și, prin urmare, a performanței de creștere (Habtamu et al, 2022).

Astfel, se poate observa că pulberea de turmeric poate fi folosită în siguranță și economic ca aditiv natural în dieta puilor broiler datorită prezenței principiilor bioactive responsabile pentru efectele benefice asupra sănătății și asupra carnii de pui broiler.

1.4.2. Inflamația intestinală, integritatea barierei și modificările intestinale în timpul administrării suplimentelor naturale în dieta păsărilor

Administrarea turmericului în dietă poate reduce inflamația intestinală, îmbunătățește digestibilitatea nutrienților și metabolismul.

Interleukina 1 (IL-1), IL-6 și factorul de necroză tumorală alfa (TNF- α) sunt cele mai investigate citokine proinflamatorii care pot fi exprimate de monocite și macrofage după identificarea agenților patogeni. Aceste citokine mediază schimbările metabolice, care sporesc răspunsul imun și rezistența la boli, crescând astfel performanțele de creștere. La păsările de curte, expresia mRNA a IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 și superfamilia 15 a factorului de necroză tumorală au fost îmbunătățite în macrofagele puilor tratați in vitro cu extract organic de turmeric. Rezultatele hibridizării microarray au demonstrat că expresia genică a mieloperoxidazei, grupul de diferențiere 28 și lactotransferina ce sunt asociate cu răspunsul inflamator la pui, a fost reglată în jos prin tratamentul cu extract organic de turmeric. În plus, Lubbad și colab. au raportat că ar putea suprima inflamația prin reducerea nivelurilor de proteine ale TLR4, MyD88 și NF κ B.

Joncțiunile strânse formează o barieră de permeabilitate selectivă pe toată suprafața stratului celular epitelial ce este crucială pt. funcțiile epiteliale normale. Funcțiile barierei formată din joncțiuni strânse sunt în mare parte o consecință a compoziției lor moleculare, compoziție influențată și de dietă. Procesul de filtrare poate depinde de mai mulți factori. În primul rând, microorganismele care intră trebuie să aibă o nișă spațială și nutrițională adecvată la nivel intestinal. Susținerea reproducerii microbiene este realizată cu ajutorul compoziției hranei ce afectează persistența microorganismelor prezente. În al doilea rând, aportul de hrană și timpul de retenție al conținutului intestinal afectează nivelul la care bacteriile sunt pierdute prin excreție. În al treilea rând, persistența unui microorganism în intestin depinde în mare măsură de interacțiunile cu alte microorganisme. Toate bacteriile au nevoie de o sursă de energie. Totuși aceste surse de energie pot diferi de la o specie la alta și de la o tulpină la alta. Bacteriile concurează pentru nutrienți. De

asemenea produsul ce rezultă în urma procesului metabolic al unei tulpini poate fi utilizat în nutriția altei tulpini, într-un proces denumit alimentație încrucișată metabolică. În al patrulea rând, bacteriile colonizatoare trebuie să supraviețuiască potențialelor răspunsuri imune ale gazdei.

Ca și concept general se poate formula ideea conform căreia caracteristicile unei comunități dintr-un ecosistem sunt modelate de factorii de mediu, iar succesiunea ecologică are loc atunci când acești factori sunt modificați. Succesul acestei relații este demonstrat în mod clar de capacitatea sistemului imunitar al mucoaselor de a menține toleranța la stimuli inofensivi (Yudiarti et al, 2018). Activitatea antiinflamatorie a curcuminei poate fi responsabilă de modularea funcțiilor celulelor imunitare ale animalelor. Raportul adâncime vilozități : criptă este un indicator al capacității digestive probabilă a intestinului subțire. O creștere a acestui raport corespunde unei creșteri a digestiei și absorbției.

În ceea ce privește înălțimea vilozităților/adâncimea criptelor au fost caracterizate printr-un gradient în scădere de la duoden la ileon. Prin adăugarea de turmeric în dieta puilor s-a observat o mărire a suprafeței de absorbție printr-un raport mai mare adâncime criptă: înălțime vilozitate. De asemenea diametrul vilozităților la baza acestora a fost influențat în mod pozitiv. Creșterea înălțimii vilozităților intestinale și raportul dintre înălțimea acestora și adâncimea criptelor este un indiciu al zonei vaste de absorbție a nutrienților și al unei funcții de absorbție mai bune. Epiteliul intestinal mai subțire îmbunătățește absorbția nutrienților și reduce necesitățile metabolice ale sistemului gastro-intestinal.

Subțierea pereților peretelui gastro-intestinal s-ar putea datora inhibării producției microbiene de poliamine și acizi grași volatili, cunoscuți pentru a crește rata de conversie și activitatea enterocitelor (Hachung et al, 2012).

1.4.3. Spirulina platensis – structură chimică, proprietăți

Alga verde-albastră (Spirulina platensis) este întâlnită în întreaga lume, valoarea sa nutritivă fiind foarte bine documentată. Aceasta conține o proporție ridicată de proteine (50-70% în greutate uscată) fiind considerată o sursă bună de aminoacizi esențiali, aspect confirmat de Farag M. R. și colab. Ross și Dominy (1990) au analizat compoziția *Spirulina platensis* și au găsit valori similare de proteină brută (60,5%) și fosfor (0,95%), o cantitate de substanță uscată (94,5%). Conform unui alt studiu întocmit de Becker (2007), în funcție de sistemul de cultivare a algelor, valoarea proteinei brute din substanța uscată a spirulinei poate varia între 46 și 63%, iar cea a extractului eteric între 4,0 și 9,0%, în funcție de sistemul de cultivare a acestor alge (Ribeiro et al, 2011). S-a observat ca aminoacizii, în cazul acestor alge, ar putea fi comparabil și chiar superior celor din

alte alimente, și, de asemenea, prezintă un grad ridicat de digestibilitate al nutrienților. În dietele pentru păsări de curte, algele pot fi utilizate până la 10% ca înlocuitor parțial al proteinelor convenționale fără efecte adverse însă nivelurile care depășesc 20% au dus la o scădere a ratei de creștere a acestora. De asemenea, Spirulina este recunoscută ca având o gamă largă de nutrienți esențiali. În plus conține acizi grași esențiali și polizaharide, vitamine și minerale, dar și carotenoizi.

Clement și colab. (1967) a raportat, de asemenea, un profil de aminoacizi favorabil, cu excepția aminoacizilor cu sulf. Aceștia au descoperit că spirulina este bogată în P-caroten, tiamina, riboflavina, piridoxină, vitamina B12 și vitamina C. Spirulina este foarte bogată în beta-caroten. Compoziția în carotenoidă a spirulinei (*Spirulina platensis*) a fost determinată folosind HPLC (cromatografie de lichide de înaltă performanță). Spirulina uscată prin congelare a avut o concentrație totală de xantofile de 5.787 mg / kg. Conținutul mai mare de carotenoizi din Spirulina ajută la suplimentarea vitaminei A iar astfel se îmbunătățește imunitatea printr-o activitate antioxidantă mai bună. Studii legate de utilizarea beta-carotenului în dieta animalelor indică o reducere mai mică, dar semnificativă din punct de vedere statistic, a numărului și dimensiunii tumorilor. Spirulina *platensis* are un profil nutrițional excelent și ar putea fi folosită în siguranță ca resursă furajeră pentru a susține hrana pentru puii de carne producția de pui (Parag et al, 2015).

Venkataraman et al. (1994), Mariey et al. (2014) au adăugat diferite niveluri de Spirulină 0,1, 0,2 și 0,3 g Spirulină/kg în dieta puilor de carne comerciali și au înregistrat consumul de hrană în timpul perioadei de start. Au concluzionat că puii au consumat o cantitate semnificativ mai redusă de furaje. În timpul perioadei de finisare, tratamentele alimentare nu au avut efecte semnificative asupra consumului de hrană al păsărilor. Cu toate acestea, Halle et al. (2009) au raportat o reducere semnificativă a consumului de furaje la găinile ouătoare atunci când în dieta acestora au fost incluse 7,5 g/kg de *Chlorella vulgaris* măcinată și uscată prin pulverizare. Creșterea greutatei corporale a găinilor după 8 săptămâni de hrănire cu Spirulina *platensis* poate contribui la îmbunătățirea eficienței utilizării hranei, la îmbunătățirea absorbției de vitamine și minerale și la optimizarea procesului de digestie a nutrienților. S-a raportat că Spirulina are numeroase beneficii pentru sănătate, incluzând activități antioxidante, imunomodulatoare, antiinflamatoare, anticancerigene, anti-virale și anti bacteriene datorită prezenței fitocianinei și beta-carotenului.

Rolul primar al hranei este nu doar de a asigura suficienți nutrienți pentru efectuarea tuturor cerințelor metabolice ale corpului, ci și de a modula diversele funcții ale acestuia. Hrana cu spirulină poate crește populația de *Lactobacillus*. De

asemenea poate îmbunătăți gradul de absorbție a vitaminelor din dietă. Numărul de bacterii coliforme a fost mai mic ($P < 0,05$) la nivel ileal în ziua 21 decât în la început sau în ziua a 7-a dar diferența nu a fost semnificativă în comparație cu cea de la păsările hranite cu Spirulina 1% până în ziua 35. De asemenea s-a observat o tendință ($P = 0,08$) pentru un număr mai mic de bacterii coliforme în conținutul intestinal cecal în ziua 21 decât la celelalte păsări. Nu au existat diferențe ($P > 0,05$) în ceea ce privește numărul de enterobacterii și lactobacili atât în ileon, cât și în cecum la puii broiler. Sub influența *Spirulina platensis*, masa puilor a crescut cu 6%, iar rata de conversie a hranei a fost îmbunătățită cu 6.3%. Spirulina a acționat de asemenea ca agent hepatoprotector (Parag et al, 2015).

Acesta a fost folosit în întreaga lume ca și componentă în hrana puilor de carne și a găinilor ouătoare pentru a îmbunătăți culoarea gălbenușului, carnea dpdv organoleptic și fertilitatea ouălor (Parag et al, 2015). Imunoglobulinele IgG, IgM și IgA au fost mai numeroase la păsările hrănite cu suplimente alimentare în comparație cu grupul de control. Titrul de anticorpi împotriva bolii de Newcastle, a gripei aviare și a bursitei infecțioase a crescut numeric la administrarea de Spirulina în comparație cu grupul de control.

Tratamentele dietetice au crescut ($p < 0,001$) nivelurile de glutatation peroxidază și superoxid dismutază (SOD), cu excepția dietei care conține 5 g Spirulina pentru nivelul SOD și au scăzut ($p < 0,001$) nivelul de malondialdehidă (Eid et al, 2022). În ceea ce privește imunitatea, studiile anterioare realizate de Qureshi et al. (1996) și Raju et al. (2004) au raportat că hrănirea cu *S. platensis* în proporție de 1% a îmbunătățit răspunsurile imune umorale și celulare și a determinat dezvoltarea organelor limfoide ale puilor. Recent, Lokapirnasari și colab. (2016) au arătat că tratamentul cu *S. platensis* a crescut numărul de leucocite și a scăzut rata mortalității puilor broiler. În recenzia lor, Farag et al. (2016) au subliniat faptul că substanțele antimicrobiene și imunomodulatoare (și antiinflamatorii), precum și potențialul antioxidant păreau a fi responsabile pentru efectul de promovare a sănătății *S. platensis* asupra păsărilor de curte.

Concomitent, numărul de eozinofile a avut tendința ($P = 0,07$) de a fi mai mic la loturile în a căror dietă a fost adăugată Spirulina decât la păsările din lotul martor. Parametrii biochimici serici și titrul de anticorpi împotriva virusului Newcastle nu au fost diferiți ($P > 0,05$) între grupurile de tratament spre deosebire de alte studii (Yudiarti et al, 2018). Suplimentarea dietei cu *S. platensis* a crescut numărul de eritrocite a hemoglobinei la puii broiler. Adaosul de alge pe toată durata de creștere în dieta puilor a dus la valori mai mici ale numărului de eritrocite și valori mai mici ale hemoglobinei și hematocritului iar cauza acestei scăderi nu este cunoscută până astăzi. În paralel cu profilul eritrocitar, numărul de leucocite,

limfocite și eozinofile au fost mai scăzute la păsările suplimentate cu *S. platensis* în timpul perioadei de creștere. Aceste constatări au fost diferite de cele raportate de Jamil et al. (2015) și Lokapirnasari et al. (2016), care au arătat o creștere leucocitelor odată cu hrănirea cu *S. platensis* la puii broiler. Date interesante au fost observate în studiul lui Shanmugapriya et al. (2015a), la care hrănirea cu 1,5 % din *Spirulina* a dus la o greutate corporală finală mai mică în comparație cu hrănirea cu 0,5 sau 1 % din *S. platensis*. Există posibilitatea ca aportul excesiv de *S. platensis* să ducă la tulburări metabolice și să afecteze funcția hepatică ceea ce duce la o rată de creștere întârziată la puii de carne (Sugiharto et al, 2018). Totuși *Spirulina platensis* poate fi utilizată ca supliment în cantitate de 1 kg pe tona de hrană pentru puii broiler.

PARTEA a II-a CERCETĂRI PROPRII

PART II. PERSONAL RESEARCHES

II. Prezentare generală a cadrului organizatoric

Cercetarea clinică a avut loc în sistem gospodăresc iar studiul de laborator s-a efectuat în cadrul Universității de Științe Vieții Iași, în laboratorul de histologie și embriologie al Facultății de Medicină Veterinară.

II.1. PROIECTAREA PROTOCOLULUI EXPERIMENTAL PENTRU REALIZAREA TEMEI PROPUSE

II.1.1. Scopul, obiectivele și structura cercetărilor

Scopul prezentei teze de doctorat este de a evalua efectul turmericului și al ZooBior2 asupra țesutului limfoid asociat mucoasei digestive, integrității barierei intestinale, a puilor broiler crescuți în sistem gospodăresc.

Principalele **obiective** ale tezei sunt:

1. Efectul turmericului și ZooBior2 asupra barierei biologice epiteliale intestinale
2. Expresia IHC a unor anticorpi proinflamatori la nivelul mucoasei intestinale
3. Rolul antiinflamator prin evaluarea expresiei Nrf2
4. Studiul reactivității țesutului limfoid asociat mucoasei intestinului subțire la cei 2 antioxidanți naturali
5. Efectele turmericului și ZooBior2 asupra creșterii în greutate la puii broiler respectiv la găinile ouătoare
6. Evaluarea ratei de convesie a furajelor după expunerea puilor broiler la turmeric și a găinilor ouătoare la ZooBior2

Protocol experimental pe pui broileri cu turmeric

Cercetările cuprind două experimente realizate astfel:

- Studiu clinic efectuat în sistem gospodăresc;
- Cercetare în laborator în urma prelucrării probelor biologice, includerea la parafină, sectionarea, colorarea, microfotografierea și interpretarea.

La o zi după eclozare, 32 de pui masculi, hibridul studiat (COBB 500) au fost împărțiți aleatoriu în 4 grupuri de tratament ($n = 8$; câte o replică pentru fiecare grup). Greutatea corporală inițială nu a fost diferită între grupuri (media $49 \pm 0,7$ g/ pui). Fiecare grup a fost crescut timp de 42 de zile în cuști pe sol (o cușcă colectivă pentru fiecare grup). Fiecare pasăre din fiecare grup a fost marcată individual în scopul identificării. Pe tot parcursul experimentului, s-au aplicat proceduri convenționale de creștere și gestionare în conformitate cu legislația în vigoare. Protocolul experimental a fost evaluat și aprobat de Comitetul de Etică al Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe ale Vieții "Ion Ionescu de la Brad".

Pulberea de turmeric (marca: HerbalSana; țara de origine: India) utilizată în experiment a avut următoarea valoare nutritivă, conform mențiunii de pe etichetă: grăsimi totale - 9,7 g, din care 1,8 g acizi grași saturați; carbohidrați - 44,4 g, din care zaharuri 3,2 g; fibre alimentare - 22,7 g; proteine - 9,7 g; sare - 0,07 g / 100 g pulbere de turmeric. Din pulberea de turmeric s-au determinat curcumina și conținutul total de fenoli. Conținutul de curcumină a fost de $1,13 \pm 0,06$ g / 100 g pulbere de turmeric, determinat spectrofotometric (Chauhan et al, 1999). Conținutul total de fenoli a fost de $2,703 \pm 0,110$ g de echivalenți de acid galic (GAE) / 100 g de pulbere de turmeric, așa cum a fost determinat conform unei metode descrise anterior (Luca et al, 2022).

Puii din grupul de control (C) au fost hrăniți cu o dietă comercială pe bază de porumb și soia: starter (1-14 zile), grower (15- 28 zile), finisher (29 - 42 zile), în conformitate cu orientările NRC (1994). Păsărilor din grupul E1 li s-a oferit aceeași dietă, dar suplimentată cu 5 g de pulbere de turmeric/kg. În același timp, păsările din grupul E2 au primit o dietă cu un adaos total de 10 g de pudră de turmeric/kg. Păsările din grupul E3 au primit o dietă cu un adaos total de 20 g de pudră de turmeric/kg.



Figura 1.1. Pui în prima săptămână de viață-LE1 (stânga). Pui de o zi-LE2 (dreapta)

Figure 1.1. Chick in the first week of life LE1 (left). Day-old chick LE2 (right)



Figura 1.2. Pui- 22 zile-LE3 (stânga). Pui -14 zile-LE1 (mijloc). Dieta de bază+20g turmeric ce urma a fi omogenizată (dreapta)

Figure 1.2. Chick- 22 days-LE3 (left). Chick -14 days-LE1 (middle). Base diet+20g turmeric to be homogenized (right)

Toți puii au avut acces la hrană și apă pentru consum, ad libitum. Hrana a fost concepută astfel încât să satisfacă cerințele puilor în toate etapele de creștere, așa cum se recomandă în ghidul de management nutrițional pentru hibridul studiat (COBB 500). Trei diete separate cu nutreț mixt au fost elaborate, specifice fiecărei perioade de creștere a puilor, și anume hrana pentru începători, pentru creștere și pentru finisare (tabel 1.1, 1.2, 1.3). Pulberea de turmeric a fost bine amestecată cu furajul care curge liber. Toți reactivii utilizați au fost de calitate analitică.

Tabel 1. Dieta starter

Table 1. Starter diet

Se administrează	pui de găină (de carne și rasă mixtă) de la 1 zi la 21 de zile
Tip de produs	furaj complet, nu trebuie combinat cu alte cereal
Compoziție	Proteină brută 20,45 %, Calciu 1,00 %, E.M. păsăr 11,72 Mj, Fosfor 0,60 %, Grăsime 2,57 %, Sodiu 0,14 %, Celuloză 3,29 %, Vitamina A 10045 UI, Metionină 0,45 %, Vitamina D 5022 UI, Metionină+Cistină 0,80 %, Vitamina E 75 UI, Lizină 1,03 %, Coccidiostatic present

Furajul este fabricat din materii prime selecționate destinate produselor starter. Furajul pentru puii de carne are conținut nutritiv foarte bine echilibrat pentru a asigura o pornire excelentă a creșterii și dezvoltării puilor.

Dieta de creștere

În etapă de creștere cerințele de energie rămân aceleași, scade nevoia de proteine și foarte puțin cea de minerale. Însă, creșterea rapidă trebuie susținută cu hrană adecvată pentru dezvoltare și creșterea în greutate.

Furajul de la Viva este granulat, granulele fiind puțin mai mari decât cele de starter. Granularea furajelor nu face decât să furnizeze hrana în forma de boabă, agreată de păsări. În procesul de granulare furajele trec printr-o fază de sterilizare.

Tabel 2. Dieta de creștere

Table 2. Growth diet

Tip de produs:	furaj complet/ nutreț combinate
Utilizare:	se administrează ca atare, la discreție
Compoziție:	Proteină brută 18,00 %, Calciu 0,85 %, E.M. păsări 12,09Mj, Fosfor 0,57%, Grăsime 3,39 %, Sodiu 0,13 %, Celuloză3,36 %, Vitamina A 9045 UI, Metionină 0,33 %, Vitamina D 5025 UI, Metionină+Cistină0,65 %, Vitamina E 60 UI, Lizină 0,90 %, Coccidiostatic present

În perioada de finisare nevoile proteice din hrana puilor de carne scad din nou, la fel și nivelul energetic. Este perioada în care se investește în calitatea carcasei. Puii pot lua în greutate 100 g/zi. Furajul de finisare pentru puii de carne este conceput astfel încât să existe o corelație benefică între cantitatea consumată, menținerea stării de sănătate, realizarea sporului în greutate.

Tabel 3. Dieta de finisare
Table 3. Finishing diet

Tip de produs:	furaj complet/ nutreț combinate
Utilizare:	se administrează ca atare, la discreție
Compoziție:	Proteină brută 15,48 %, Calciu 0,79 %, E.M. păsări 12,28 Mj, Fosfor 0,57 %, Grăsime 3,49%, Sodiu 0,18 %, Celuloză3,59%, Vitamina A 8040 UI, Metionină0,27 %, Vitamina D 4170 UI, Metionină+Cistină 0,57 %, Vitamina E 51 UI, Lizină 0,65 %, Coccidiostatic absent

II.1.2. Supravegherea clinică, evaluarea greutateii corporale și raportul de conversie al hranei

Pentru a evalua starea de sănătate, la începutul experimentului și ulterior, păsările au fost examinate clinic permanent.

Greutatea corporală a puilor a fost înregistrată la T0 și apoi în zilele 7, 14, 21 și, respectiv, 28 și 48 zile de administrare a turmericului. Consumul de furaje a fost înregistrat zilnic pentru fiecare grup (o măsurătoare pentru întregul grup) și media a fost calculată săptămânal.

Raportul de conversie a hranei a fost calculat pentru fiecare grup la sfârșitul experimentului ca grame de hrană / grame de creștere în greutate corporală. Cinci pui din fiecare grup au fost eutanasiați printr-o supradoză de tiopental sodic în ziua 42 zile de tratament.

II.1.3. Recoltarea și prelucrarea probelor pentru examen histologic și imunohistochimie

La sfârșitul experimentului, găinile au fost eutanasiate prin dislocare cervicală. Probele de țesut din duoden, jejun, ileon și cecum de la toate loturile experimentale și de la lotul martor au fost supuse analizei morfometrice, după fixarea cu formaldehidă 4%, includerea în parafină și colorarea cu hematoxină-eozină (HE).

S-au prelevat probe de țesut de 2 cm de intestin subțire din părțile superioare (punctul de start al organului), mijlociu (punctul central al intestinului) și inferior (punctul final al organului) ale duodenului, jejunului (de la ansa pancreatică la diverticulul lui Meckel) și ileonului (de la diverticulul lui Meckel la joncțiunea ileo-ceco-colică), conform metodei lui Giannenas și colab. (2010).

Probele de țesut au fost fixate cu formaldehida tamponată 10% (NBF) timp de 72 de ore, apoi au fost deshidratate, clarificate cu xilen și incluse la parafina.

Secționarea s-a realizat la microtom la 4μm, colorate HE, microfotografiate și interpretate.

În vederea evaluării s-a urmărit:

- Înălțimea și diametrul vilozităților intestinale;
- Raportul dintre înălțimea vilozităților: adâncimea criptelor;
- Grosimea pereților intestinali cunoscuți ca indicatori ai ratei de conversie a hranei și ai activității enterocitelor;
- Evaluarea morfometrică a aglomerărilor limfoide

Colorația imunohistochimică pentru evaluarea inflamației; IL-6, TNFAI8, NFκB, Pax-7. Un marker pentru evidențierea capacității antioxidante Nrf2 pentru evidențierea expresiei acestui anticorp la nivelul epiteliului intestinal.

Etapile utilizate pentru obținerea preparatelor histologice permanente din intestine

Pentru a realiza o **recoltare** în condiții optime, instrumentul folosit trebuie să fie ascuțit cât mai bine, evitând în acest fel strivirea țesuturilor. Dimensiunea pieselor e de aproximativ 0,5 cm³: 15 mm lungime, 10 mm lățime și 5 mm grosime, pentru ca fixatorul să pătrundă repede în întreaga probă. Inițial fragmentele sunt mai mari dar după spălarea conținutului intestinal cu PBS marginile se ajustează până la dimensiunile menționate. În acest sens se face o prefixare de câteva ore, fasonare, fiind apoi introduse în fixator proaspăt.

Fixarea histologică are un triplu scop: 1. oprirea fenomenelor vitale din țesuturile fixate, pentru a surprinde microscopic aspectele histologice existente în piesă în momentul respectiv și pentru a preveni fenomenul de autoliză; 2. creșterea consistenței pieselor fixate în vederea operațiunilor histologice ulterioare; 3. sterilizarea pieselor, majoritatea fixatorilor chimici fiind buni dezinfectanți. Volumul fixatorului îl depășește de aproximativ 20 ori pe cel al pieselor din interior.

S-a utilizat formaldehidă (formol ca fixator chimic simplu) 10% și Bouin (fixator compus). Fixatorul Bouin este format din acid picric soluție suprasaturată (750ml), formaldehidă 40% (250ml) și acid acetic glacial (50ml).

Timpul de staționare în acest fixator a fost de 12 ore. Se preferă acest fixator compus pentru capacitatea de fixare prin coagularea proteinelor structurale, buna viteză de penetrare, toleranță și intervalul de timp foarte mare pe durata căruia se asigură conservarea.

Includerea la parafină se derulează în patru faze succesive:

1. **Deshidratarea.** Deshidratarea este necesară pentru eliminarea apei din țesuturi, în vederea impregnării ulterioare în parafină a pieselor. Se realizează trecând piesele prin următoarele băi cu alcool în concentrații progresiv crescând: 50°, 70°, 80°, 90° și alcool absolut. Durata de menținere a fragmentelor în fiecare baie este de două ore.
2. **Clarificarea.** Executată în vederea extragerii etanolului din piese, acesta nefiind miscibil cu parafină. Pentru această operațiune se folosesc două băi cu xilen, în fiecare baie piesele menținându-se câte două ore.
3. **Impregnarea cu parafină.** Obiectivul acestui timp operator este de a aduce piesele într-o stare de rigiditate și de omogenitate optimă în vederea secționării. Operațiunea se execută în termostatul de includere în parafină, la temperatura de 56 ° C, în trei băi de parafină lichidă, câte două ore în fiecare baie.
4. **Includerea propriu-zisă.** Includerea propriu-zisă sau turnarea blocului are drept scop încorporarea piesei impregnată cu parafină, într-un bloc din același material. Turnarea blocului se efectuează cu ajutorul unor forme de plastic.

Secționarea pieselor histologice se realizează cu ajutorul microtomului pentru parafină, care oferă condiții pentru obținerea unor secțiuni cu grosimea de 5 μm. În timpul secționării, țesuturile incluse în parafină vor fi ușor comprimate și vor apărea pliuri, ambele fenomene făcând secțiunile improprii pentru examenul microscopic. Pentru eliminarea acestui inconvenient, se recurge la etalarea secțiunilor pe lame de sticlă port-obiect cu ajutorul apei distilate la o temperatură de 45°C.

Secțiunile au fost **colorate** prin următoarele metode de colorare histologică:

a) Hematoxilină - Eozină - Albastru de metil (HEA)

I.Deparafinare: Benzen I (10 minute); Benzen II (10 minute); Benzen III (10 minute)

II. Rehidratare: Alcool etilic absolut (10 minute); Alcool etilic 90° (10 minute); Alcool etilic 80° (10 minute); Apă distilată (10 minute).

III. Colorare: Hematoxilină Mayer (10 minute); Apă robinet pasaj; Apă litinată (10 minute); Apă distilată pasaj; Eozină 1% (10 minute); Apă distilată pasaj

IV.Deshidratare: Alcool etilic 80° (10 minute); Alcool etilic 90° (10 minute); Alcool etilic absolut (10 minute)

V.Clarificare: Benzen I (10 minute); Benzen II (10 minute); Benzen III (10 minute)

Montarea. Aceasta se efectuează prin depunerea între secțiunea de pe lama port-obiect și lamelă a unui mediu cu același indice de refracție ca al sticlei, respectiv balsamul de Canada.

Microfotografiile au fost obținute folosind microscopul cu camera Leica.

Colorații imunohistochimice

Probele de intestin au fost recoltate, incluse în parafină și secționate la 4 μ m. Acestea au fost deparafinate, iar epitopii din secțiuni au fost dezvăluiți prin încălzire la 95 ° C în 10 mmoli de tampon acid citrat la pH 6, timp de 10 min în cuptor cu microunde și apoi au fost lăsate la temperatura camerei timp de 20 min. Lamele au fost apoi spălate de două ori în PBS (pH 7,5) timp de 5 min. Secțiunile de țesut au fost incubate cu anticorpi anti-IL-6 (producător: Abbexa; cod: abx177189), anti-TNFIP8 (furnizor: Antibodies-online GmbH; cod: ABIN2707009) și anti-Pax-7 (furnizor: Antibodies-online GmbH; cod: ABIN 27434880). Anticorpii primari anti-IL-6, -TNF α anti-pax7 și anti-Nrf2, anti-p65 și s-au diluat 1: 100 la temperatura camerei într-o camera umedă la 4°C peste noapte. Adoua zi se realizeaza spălarea cu PBS, apoi incubarea cu anticorpus secundar, HRP IgG, timp de 1 oră, într-o cameră umedă, apoi spălate cu PBS și incubate cu substratul de 3,3 ' diaminobenzidină timp de 3 min și contracolorat cu hematoxină Harris, clarificare în xilen și montare cu balsam de Canada. Secțiunile au fost microfotografiate și din fiecare câmp, au fost măsurate 3 viloziități conform protocolului altor autori (Kawalilak et al., 2010).

II.2. EVALUAREA HISTOLOGICĂ, IHC ȘI A RATEI DE CONVERSIE A FURAJELOR DUPĂ EXPUNEREA PUILOR BROILER LA TURMERIC

Rezultatele analizei morfometrice și ale creșterii în greutate au fost exprimate ca medie $\pm$ deviație standard. Pentru a evalua variația datelor între grupuri, s-a utilizat ANOVA cu o singură cale, urmată de testul post-hoc Tukey. Nivelul de semnificație a fost stabilit la 0,05.

S-a efectuat o analiză de regresie pentru a evalua relația dintre doza de turmeric din furaje ca factor (variabilă independentă) și parametrii privind histologia duodenală ca răspuns (variabile dependente). Au fost testate modelele liniare, pătratice (polinomial de gradul al doilea) și cubice (polinomial de gradul al treilea) și au fost calculate ecuațiile de regresie, coeficienții de determinare (R^2) și erorile standard ale estimărilor. Pentru analiza statistică au fost utilizate IBM SPSS 20 și MS Excel 2007.

II.2.1. Efectul turmericului asupra mucoasei intestinale la puii broiler

Rezultate

Duodenul a prezentat o serie de modificari specific inflamației la lotul control mai evidente, Acestea au constat în infiltrații limfoide difuze intraepiteliale, în axul vilozităților intestinale și periglandular (Fig.2.1, 2.2, 2.3). Bariera intestinală a fost distrusă la polul luminal al vilozităților. Tunica musculară apare îngroșată. Aceste modificări se reduc în intensitate la loturile experimentale.

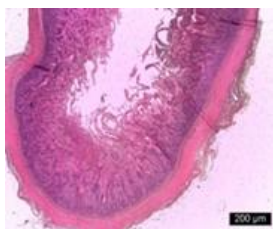


Figura 2.1. .Duodenul puilor din Lotul Control. Vilozitățile intestinale sunt subțiri cu edem și desprinderea epiteliului în zona apexului. -Colorație HEA x100

Figure 2.1. Duodenum of the Control batch chicks. The intestinal villi are thin with oedema and epithelial detachment in the apex area -HEA staining x100

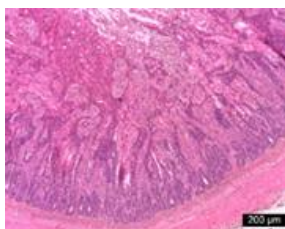


Figura 2.2. Peretele duodenului la lotul martor. Polul luminal al vilozităților intestinale se distinge foarte greu datorită desprinderii acestora și a conținutului luminal cu care se întrepatrunde. Colorație HE x100.

Figure 2.2. Duodenum prices in the control group. The luminal pole of the intestinal villi is very difficult to distinguish due to their detachment and the luminal content with which they intertwine. HE stain x100

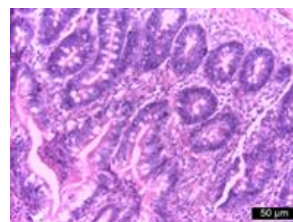


Figura 2.3. Duoden de la Lotul Control. În axul vilozităților intestinale și periglandular se observă infiltrat cu limfocite, edem, pe alocuri ruperea barierei epiteliale. Colorație HEA x400

Figure 2.3. Duodenum from the Control Lot. In the axis of the intestinal villi and periglandular infiltrate with lymphocytes, oedema, and sometimes rupture of the epithelial barium are observed. - HEA stain x400

La lotul control diametrul vilozităților duodenale (la bază) a fost de $139.65 \pm 40.14 \mu\text{m}$, raportul înălțime vilozitate: adâncime criptă a avut o valoare de $6.52 \pm 0.32 \mu\text{m}$ iar înălțimea vilozităților a fost de $880.33 \pm 73.14 \mu\text{m}$. Adâncimea criptelor a fost de $135,33 \pm 13.57 \mu\text{m}$.

Prin adaosul 0,5% turmeric în dietă (LE1), vilozitățile intestinale și-au pierdut parțial integritatea către polul luminal. În lamina propria se observă rare limfocite dispuse difuz (fig 2.4.). Printre enterocite se observă frecvent celule caliciforme (fig 2.5.). Musculoasa este mai subțire decât la lotul martor (fig 3.6.).

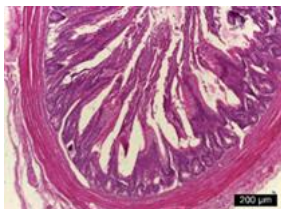


Figura 2.4. Duoden LE1. Vilozități intestinale vizibile, mai integre decât la lotul control. Se pot observa unele desprinses în polul luminal. Colorație HEA x100.

Figure 2.4. Duodenum LE1. Visible intestinal villi, more intact than in the control group. Some detachments can be seen in the luminal pole. HEA staining x100

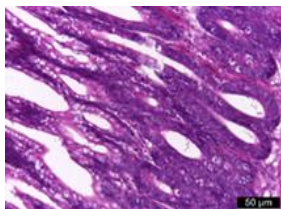


Figura 2.5. Vilozități acoperite de epiteliu columnar format din enterocite și celule caliciforme frecvente. Colorație HEA

Figure 2.5. LE1 Villi covered by columnar epithelium consisting of enterocytes and frequent goblet cells. HEA staining

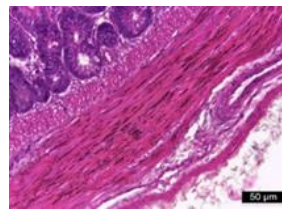


Figura 2.6. Duoden LE1. Straturile circular intern, îngroșat și longitudinal extern al musculoasei.-Colorație HEA

Figure 2.6. Duoden LE1. Internal circular, thickened and external longitudinal layers of the muscularis.-HEA staining

La LE1, prin adaosul de 0,5% turmeric, diametrul vilozităților duodenale (la bază) a fost de $131.47 \pm 38.98 \mu\text{m}$, raportul înălțime vilozitate: adâncime criptă a avut o valoare de $8.71 \pm 2.00 \mu\text{m}$ iar înălțimea vilozităților a fost de $1085.00 \pm 79.56 \mu\text{m}$. Adâncimea criptelor a fost de $128,33 \pm 24.58 \mu\text{m}$.

Vilozitățile intestinale la LE2 prin adaosul 1% turmeric în dietă sunt lungi, cu un diametru subțire pe toată înălțimea. Bariera epitelială este integră, puține enterocite se desprind de la vârful apical luminal al vilozităților. În axul vilozităților limfocitele sunt rare, pe alocuri intraepiteliale. Tunica musculară este cea mai subțire comparativ cu celelalte LE.

La LE2 prin adaosul de 1 % turmeric, diametrul vilozităților duodenale (la bază) a fost de $155.25 \pm 26.13 \mu\text{m}$, raportul înălțime vilozitate: adâncime criptă a avut o valoare de $10.09 \pm 1.50 \mu\text{m}$ iar înălțimea vilozităților a fost de $1190.00 \pm 8.54 \mu\text{m}$. Adâncimea criptelor a fost de $119,66 \pm 17.03 \mu\text{m}$.

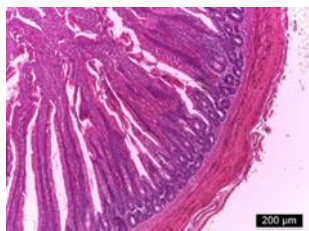


Figura 2.7. Duoden LE2. Vilozitățile intestinale sunt lungi, au diametru redus, epiteliul columnar care-și păstrează integritatea, adâncimea criptelor este redusă. Tunica musculară este subțire comparativ cu a lotului control -Colorație HEAx100

Figure 2.7. Duoden LE2. Intestinal villi are long, small diameter, columnar epithelium preserving its integrity, crypt depth is reduced, muscular tunic is thin compared to control -HEAx100 staining

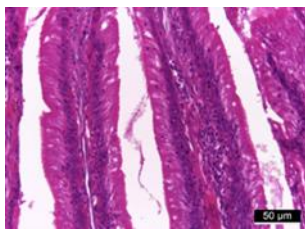


Figura 2.8. Vilozități intestinale de la lotul E2, duoden. În axul vilozităților intestinale, se observă infiltrat limfocitar redus în lamina propria și pe alocuri limfocite intraepiteliale. Col HE x400

Figure 2.8. Intestinal villi from the control group, duodenum. Lymphocytic infiltrate in lamina propria and numerous intraepithelial lymphocytes. Col HE x400

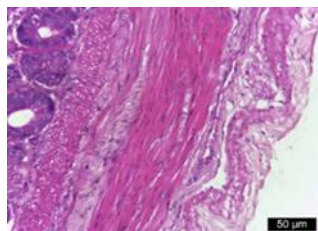


Figura 2.9. Duoden LE2 – Tunica musculară cu stratul circular intern ceva mai subțire comparativ cu lotul control.-Colorație HEAx400

Figure 2.9. Duoden LE2. Muscle tunic with slightly thinner inner circular layer compared to the control batch.-Color HEAx400

Duodenul puilor din LE3 au vilozitățile lungi, au diametru care variază, uneori acesta este foarte mare, epiteliul columnar care-și păstrează integritatea parțial, adâncimea criptelor este redusă, Tunica musculară este subțire comparativ cu a lotului control. Vilozitățile intestinale prezintă bariera epitelială integră la bază, adâncimea criptelor este medie comparativ cu a LE2. Tunica musculară are un diametru sensibil mai mare decât LE2.

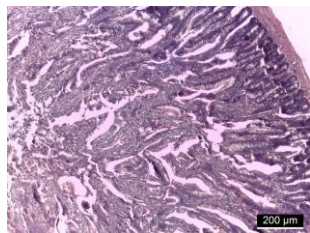


Figura 2.10. .Duoden LE3-Vilozitățile intestinale sunt lungi, au diametru care variază, epiteliul columnar care-și păstrează integritatea parțial, adâncimea criptelor este redusă, Tunica musculară este subțire comparativ cu a lotului control. Colorație HEA

Figure 2.10. Duodenum LE3-The intestinal cavities are long, varying in diameter, columnar epithelium partially retaining its integrity, crypt depth is reduced, muscular tunic is thin compared to control. HEA staining

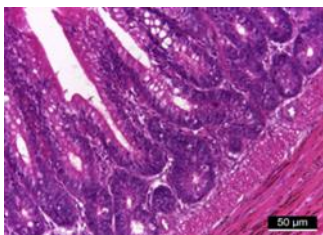


Figura 2.11.. Duoden LE3. Vilozitățile intestinale prezintă bariera epitelială integră la bază, adâncimea criptelor este medie comparativ cu a LE2

Figure 2.11. Duodenum LE3-The intestinal cavities are long, varying in diameter, columnar epithelium partially intact, crypt depth is reduced, muscular tunic is thin compared to control. HEA staining

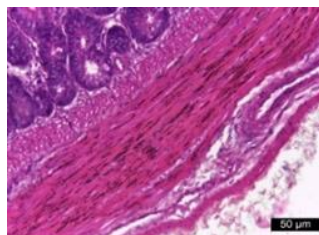


Figura 2.12. Duoden LE3. Tunica musculară cu stratul circular intern evident.-Colorație HEAx100

Figure 2.12. Duoden LE3. Muscle layer with obvious inner circular layer. .-HEAx100 staining

La LE3, prin adaosul de 2 % turmeric, diametrul vilozităților duodenale (la bază) a fost de $199.51 \pm 60.99 \mu\text{m}$, raportul înălțime vilozitate: adâncime criptă a avut o valoare de $5.62 \pm 2.06 \mu\text{m}$ iar înălțimea vilozităților a fost de $980.66 \pm 130.90 \mu\text{m}$.

Rezultatele sintetizate ale analizei morfometrice duodenale sunt prezentate în tabelul de mai jos. Parametrii morfometrici ai mucoasei duodenale au prezentat diferențe între grupul de control și grupurile experimentale.

Tabel 4. Efectele adaosului de turmeric la diferite niveluri (Curcuma longa) în dieta puilor broiler asupra structurii histologice duodenale (mean $\pm$ standard error)

Table 4. Effects of adding turmeric (Curcuma longa) at different levels to the diet of broiler chickens on duodenal histological structure (mean $\pm$ standard error)

LOT	Diametrul vilozităților duodenale (la bază) (μm)	Raportul vilozitate: adâncime criptă	înălțime adâncime	Înălțimea vilozităților (μm)	Adâncimea criptelor (μm)
C	139.65 ± 40.14^a	6.52 ± 0.32		880.33 ± 73.14^{ab}	135.33 ± 13.57
LE1	131.47 ± 38.98^b	8.71 ± 2.00		1085.00 ± 79.56^a	128.33 ± 24.58
LE2	155.25 ± 26.13	10.09 ± 1.50^a		1190.00 ± 8.54^{bc}	119.66 ± 17.03
LE3	199.51 ± 60.99^{ab}	5.62 ± 2.06^a		980.66 ± 130.90^c	187.66 ± 56.63

a, b, c, d – within a column, means with the same letter differ significantly at 0.05;

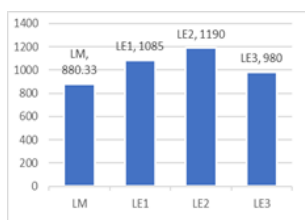


Figura 2.13. Înălțimea vilozităților duodenale
Figure 2.13. Duodenal villi height

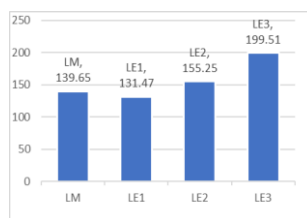


Figura 2.14. Diametrul vilozităților duodenale
Figure 2.14. Duodenal villi diameter

În grupul E1, prin adăugarea a 0,5 % pulbere de turmeric în hrana pentru animale, înălțimea vilozităților a crescut cu 23,24 % în comparație cu grupul de control. În cazul grupului E2 (1 % pulbere de turmeric), înălțimea medie a vilozităților a crescut cu 35,17 % în comparație cu grupul de control și cu 9,67 % în comparație cu grupul E1. LE3 este singurul lot în care se observă o adâncire a criptelor intestinale, spre deosebire de LE 1 sau LE2, unde se observă o scădere a adâncimii medii a criptelor. Suplimentarea cu pulbere de turmeric a avut tendința de a reduce adâncimea criptei.

Cele mai mari diametre ale vilozităților duodenale au fost identificate în LE3, prin adăugarea a 2 % pulbere de turmeric în alimentație. Diferențele în ceea ce privește diametrul vilozităților duodenale între loturile LE1, LE2 și LE3 pot fi observate doar la baza vilozităților. Valorile au crescut odată cu adăugarea de pulbere de turmeric până la 2 % în dietă.

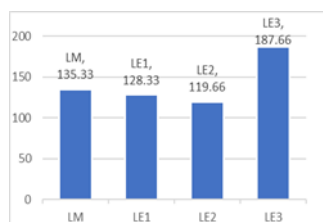


Figura 2.15. Adâncimea criptelor
Figure 2.15. Crypt depths

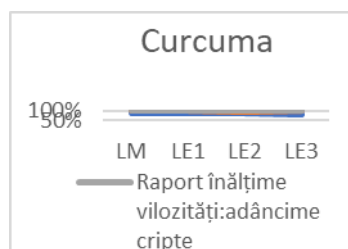


Figura 16.Efectele curcumin asupra intestinului
Figure 16 Effects of curcumin on the intestine

Cel mai bun raport înălțime vilozități: adâncime cripte a fost identificat la LE2. În cazul grupului de control, hrănit doar cu dieta de bază, s-a observat un raport mult mai mic între înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor.

Tabel 5. Analiza de regresie între nivelurile de adaos de curcuma (*Curcuma longa*) în dieta puilor de carne și parametri privind histologia duodenală

Table 5. Regression analysis between levels of added turmeric (*Curcuma longa*) in broiler diets and duodenal histology parameters

Independent variable	Dependent variable	Regression model	Regression equation	R ²	Standard error of the estimate
Nivelul de turmeric în dietă	Înălțimea vilozităților	Liniar	$Y = 34.21X + 1004.06$	0.043	130.15
Nivelul de turmeric în dietă	Înălțimea vilozităților	Pătratic	$Y = -254.03X^2 + 560.41X + 877.05$	0.902	43.83
Nivelul de turmeric în dietă	Înălțimea vilozităților	Cubic	$Y = -40.11X^3 - 139.16X^2 + 488.94X + 880.33$	0.869	45.96
Nivelul de turmeric în dietă	Adâncimea criptelor	Liniar	$Y = 27.21X + 118.93$	0.215	34.82
Nivelul de turmeric în dietă	Adâncimea criptelor	Pătratic	$Y = 37.72X^2 - 50.93X + 137.79$	0.369	31.22
Nivelul de turmeric în dietă	Adâncimea criptelor	Cubic	$Y = 30.11X^3 - 48.50X^2 + 2.72X + 135.33$	0.308	32.69
Nivelul de turmeric în dietă	Raportul înălțime vilozități:adâncime cripte	Liniar	$Y = -0.62X + 8.28$	0.044	2.36
Nivelul de turmeric în dietă	Raportul înălțime vilozități:adâncime cripte	Pătratic	$Y = -3.79X^2 + 7.23X + 6.38$	0.626	1.55
Nivelul de turmeric în dietă	Raportul înălțime vilozități:adâncime cripte	Cubic	$Y = -1.59X^3 + 0.77X^2 + 4.39X + 6.51$	0.637	1.62
Nivelul de turmeric în dietă	Raportul înălțime vilozități:adâncime cripte	Liniar	$Y = 33.07X + 127.52$	0.251	43.37
Nivelul de turmeric în dietă	Raportul înălțime vilozități:adâncime cripte	Pătratic	$Y = 18.83X^2 - 5.94X + 136.94$	0.280	43.09
Nivelul de turmeric în dietă	Raportul înălțime vilozități:adâncime cripte	Cubic	$Y = -33.06X^3 + 113.51X^2 - 64.85X + 139.65$	0.289	43.40

După cum se arată în tabelul de mai sus, relația dintre doza de turmeric adăugată în hrana pentru animale și înălțimea vilozităților, precum și adâncimea criptei, este cel

mai bine descrisă de un model de regresie pătratică, pe baza valorii R². Relația dintre doza de turmeric adăugată la hrană și raportul dintre înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor, precum și diametrul vilozităților intestinale este cel mai bine descrisă de un model de regresie cubică, pe baza valorii R². În toate cazurile, coeficienții de determinare (R²) sunt relativ mici, astfel încât modelele de regresie propuse prezic parțial rezultatul.

Discuții

Disponibilitatea și natura nutrienților în intestin au condus la modificări histologice intestinale.

Specific duodenului este prezența vilozităților în formă de frunze și a criptelor longitudinale, drepte. Vilozitățile mai lungi sunt, în general, rezultatul mitozei celulare, care are loc în cripte, o zonă în care celulele stem se divid pentru a permite reînnoirea vilozităților, o suprafață mai mare a criptelor indicând o producție celulară mai intensă (Samanya & Yamauchi, 2002). Prezența structurii de tip meandru se poate datora faptului că absorbția nutrienților este mai eficientă atunci când vilozitățile sunt dispuse în acest mod, spre deosebire de cazul în care vilozitățile sunt paralele.

Unele studii au arătat deja că ileonul a fost locul cel mai receptiv, unde vilozitățile s-au modificat semnificativ odată cu modificările nutriționale sau s-a observat o creștere a conținutului de nutrienți în lumenul intestinal (Yamauchi et al., 1992). Rezultatele experimentului realizat de Kosti et al. (2018) au arătat că adâncimea criptelor a crescut, de asemenea, odată cu înălțimea vilozităților. A existat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a adâncimii criptelor de la 189,32 microni în grupul de control la 213,79 microni în grupul experimental cu cea mai mare doză (1,0 % pulbere de turmeric). Astfel, se poate observa că includerea pulberii de turmeric în alimentație a dus la o îmbunătățire a lungimii vilozităților, a lățimii vilozităților și a adâncimii criptelor în tractul gastrointestinal al păsărilor. Într-un alt studiu, valorile medii ale lungimii vilozităților, lățimii vilozităților și adâncimii criptelor ileale la păsări au variat între 943,81 și 1148,20 micrometri (lungimea vilozităților), 192,42 și 213,29 micrometri (lățimea vilozităților) și, respectiv, 184,65 și 213,79 micrometri (adâncimea criptelor). S-a înregistrat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a valorilor medii ale lungimii vilozităților, de la 947,94 micrometri în grupul de control la 1145,77 micrometri în grupul de tratament hrănit cu cel mai ridicat nivel de pulbere de turmeric (1,0%) (Kosti et al., 2018).

Raportul dintre înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor este un indicator al capacității digestive a intestinului subțire. O creștere a acestui raport corespunde unei creșteri a digestiei și absorbției. O creștere a înălțimii vilozităților intestinale și a raportului dintre înălțimea acestora și adâncimea criptelor este un indicator al unei zone de absorbție intensă a nutrienților și al unei funcții de absorbție mai bune

Conform rapoartelor disponibile, pe lângă faptul că turmericul are acțiuni antioxidante semnificative, se poate spune că acesta ar putea fi, de asemenea, o sursă autentică de proteine și carbohidrați, în timp ce proprietățile sale benefice conduc la îmbunătățirea creșterii și a performanțelor de producție la păsările hrănite cu turmeric ca supliment alimentar (Hafez et al., 2022). În plus, s-a raportat că ar putea suprima inflamația prin reducerea nivelurilor TLR4, MyD88 și NFκB (Yoo et al., 2018). La păsările de curte, expresia ARNm a IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18 și a membrului 15 din superfamilia factorului de necroză tumorală a fost îmbunătățită în macrofagele de pui tratate *in vitro* cu extract organic de turmeric (Lee et al., 2010). Rezultatele hibridizării prin microarray au demonstrat că expresia genică a mieloperoxidazei, a grupului de diferențiere 28 și a lactotransferrinei, care sunt asociate cu răspunsul inflamator la pui, a fost reglată în jos după tratamentul cu extract de turmeric organic (Gautam & Jachak, 2009).

Activitatea antioxidantă oferă o mare speranță ca soluție pentru stresul la păsările de curte, prin creșterea activității mitocondriale Mn-SOD și a expresiei genice a tioredoxinei-2 și peroxiredoxinei-3 (Zhou et al., 2015). Curcumina, cel mai important compus activ găsit în turmeric, poate, de asemenea, să scadă nivelurile mitocondriale de malondialdehidă (Zhang et al., 2014), să crească nivelurile mitocondriale de glutatation (Park și Chun, 2017) și să crească activitățile glutatation peroxidazei (GSH-Px), glutatation S-transferazei (GSST) și superoxid dismutazei (SOD) (Zia et al., 2021). O creștere a capacității antioxidante totale la puii de carne duce la o reducere a stresului oxidativ și, de asemenea, a inflamației, cu o digestibilitate îmbunătățită și, prin urmare, a performanțelor de creștere (Gowda et al., 2009). Astfel, se poate spune că pulberea de curcuma poate fi utilizată în siguranță și în mod economic ca supliment natural în dietele pentru puii broiler, datorită prezenței substanțelor bioactive responsabile de efectele benefice asupra sănătății puilor și asupra calității cărnii. Epiteliul intestinal reprezintă o barieră naturală împotriva bacteriilor patogene și a substanțelor toxice prezente în lumenul intestinal, care pot provoca perturbări ale microflorei normale și ale epitelului intestinal. Astfel, permeabilitatea acestei bariere naturale poate fi alterată, facilitând invazia agenților patogeni și a substanțelor nocive, alterând metabolismul și capacitatea de a digera și absorbi nutrienții. Toți acești factori duc la dezvoltarea proceselor inflamatorii cronice la nivelul mucoasei intestinale. În cele din urmă, apare reducerea vitezității și scăderea activității digestive și a capacității de absorbție a enterocitelor (Oliveira et al, 1999).

II.3. Expresia imunohistochimică a markerilor IL-6, TNFAIP8 și PAX 7 la nivelul intestinului la puii broiler expuși la turmeric

Expresia TNFAIP8 este intensă la Lotul Control se evidențiază atât la nivelul epiteliului cât și în grupuri de celule din lamina propria. Intensitatea expresiei acestui marker se reduce progresiv începând cu LE3, LE1 și cea mai redusă se înregistrează la LE2. Expresia IL-6 este asemănătoare cu a TNF la toate loturile luate în studiu. Expresia Pax7 este intens spre moderată la toate loturile.

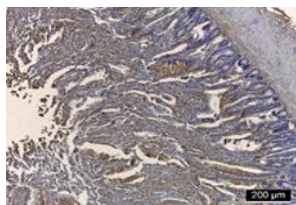


Figura 3.1. Expresia IL-6 la nivelul mucoasei duodenului la lotul control se evidențiază atât la nivelul epiteliului cât și în grupuri de celule din lamina propria. Col IHC anti-IL-6 x100

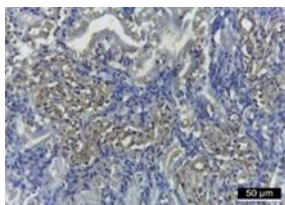


Figura 3.2. Expresia TNFAIP8 la Lotul Control apare moderată spre intensă, intracitoplasmatică, atât la nivelul epiteliului cât și în lamina propria. Figure 3.2. TNFAIP8 expression in the control group appears moderate to intense, intracytoplasmic, both in the epithelium and in the lamina propria

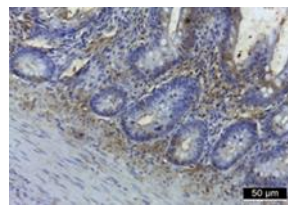


Figura 3.3. Pax 7 la Lotul Control. Se remarcă expresia intracitoplasmatică atât de la nivelul celulelor epiteliale și din lamina propria. Col IHC anti-Pax 7. Figure 3.3. Pax 7 at the Control Lot. Note the intracytoplasmic expression from both epithelial cells and lamina propria. Col IHC anti Pax 7.

Expresia markerilor IL-6, TNFAIP8 și PAX 7- LE1

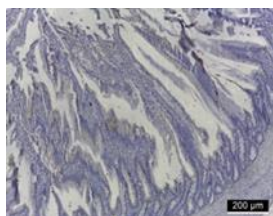


Figura 3.4. Expresia IL-6 moderată spre redusă în epiteliul duodenal al puiilor din LE1. Col IHC anti IL-6 x100

Figure 3.4. Moderate to reduced IL-6 expression in the duodenal epithelium of LE1 chicks. Col IHC anti IL-6 x100

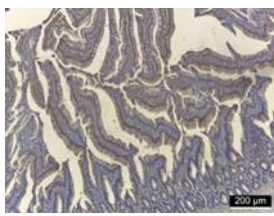


Figura 3.5. Expresia TNFAIP8 în duodenul puiilor din -LE1. Expresia TNFAIP8 în duodenul puiilor din -LE1 este moderat, mai ales la nivelul epiteliului columnar. Col IHC anti TNFAIP8x100

Figure 3.5. TNFAIP8 expression in the duodenum of -LE1 pups is moderate, especially in the columnar epithelium. Col IHC anti TNFAIP8x100

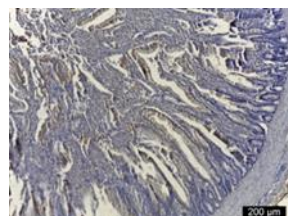


Figura 3.6. Expresia Pax 7 la nivelul epiteliului duodenului de la -LE1 este moderat, citoplasmatică. Col anti -Pax7 x100

Figure 3.6. Pax 7 expression in the duodenal epithelium from -LE1 is moderate, cytoplasmic. Col anti -Pax7 x100

Prezența TNFAIP8 este mai intensă și în LE1. De asemenea colorația Pax-7 este pozitivă.

Prin adăugarea de pulbere de turmeric în alimentație, s-a observat o reducere a expresiei IL-6 în intestin; cele mai bune rezultate au fost observate pentru un nivel de 1 % pulbere de turmeric.

Expresia markerilor IL-6, TNFAIP8 și PAX 7- LE 2

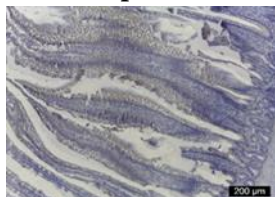


Figura 3.7. Expresia IL-6 este foarte redusă la nivelul epiteliului vilozităților intestinale ale LE2
Figure 3.7. IL-6 expression is very low in the intestinal villi epithelium of LE2

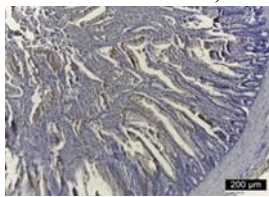


Figura 3.8. Expresia TNFAIP8 este evidentă intracitoplasmatică deși integritatea epiteliului este păstrată în duodenul puilor din - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100.

Figure 3.8. TNFAIP8 expression is evident intracytoplasmically and epithelial integrity is preserved in the duodenum of chickens from - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100.

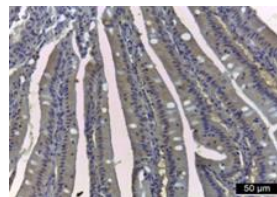


Figura 3.9. Expresia Pax 7 se menține evidentă în duodenul puilor din LE2. Diametrul vilozităților este redus și se observă integritatea barierei epiteliale. Col anti Pax 7x100.
Figure 3.9. Pax 7 expression remains evident in the duodenum of LE2 chickens. The diameter of the villi is reduced and the integrity of the epithelial barrier is observed. Col anti Pax 7x100.

Adăugarea de 1% turmeric în dieta puilor broiler din LE2 a dus la creșterea scăderea cea mai însemnată a IL-6.

Prezența TNFAIP8 se remarcă și la LE2.

Prezența TNFAIP8 este mai intensă la LE2 față de LE1.

Expresia markerilor IL-6, TNFAIP8 și PAX 7- LE 3

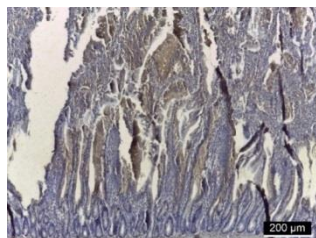


Figura 3.10. Expresia IL-6 în duodenul puilor din LE3 este moderată, mai intensă apare spre vârful vilozităților intestinale care ulterior se desprind. Col IHC anti IL-6 x100

Figure 3.10. IL-6 expression in the duodenum of LE3 chickens is moderate, more intense appearing towards the top of the intestinal villi which subsequently detach. Col IHC anti IL-6 x100

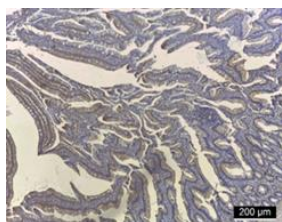


Figura 3.11. Expresia TNFAIP8 este evidentă intracitoplasmatic deși integritatea epiteliului este păstrată în duodenul puilor din - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100.

Figure 3.11. TNFAIP8 expression is evident intracytoplasmically and epithelial integrity is preserved in the duodenum of chickens from - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100

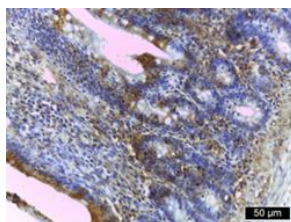


Figura 3.12. Expresia Pax 7 se menține evidentă în duodenul puilor din LE2. Diametrul vilozităților este redus și se observă integritatea barierei epiteliale. Col anti Pax 7x100.

Figure 3.12. Pax 7 expression remains evident in the duodenum of LE2 chickens. The diameter of the villi is reduced and the integrity of the epithelial barrier is observed. Col anti Pax 7x100.

În acest experiment, s-a observat o colorație pozitivă pentru IL-6 în grupurile de control și LE3, sugerând existența unui proces inflamator. Pulberea de turmeric a redus inflamația, astfel că la LE1 și LE2 imunocolorația a fost negativă pentru IL-6.

Discuții

IL-6 este o citokină multifuncțională care are o activitate proinflamatorie prin inducerea sintezei proteinelor din faza acută și este importantă în dezvoltarea răspunsurilor imune adaptative care duc la diferențierea limfocitelor B, a celulelor T citotoxice și la creșterea celulelor T (Kaiser et al., 2000). Într-un alt experiment, Alphamune® (un supliment alimentar inovator bogat în beta-glucani) a redus semnificativ expresia IL-6 în ileon atât în ziua 21, cât și în ziua 42, comparativ cu grupul de control negativ. Alphamune® conține β -glucani care s-au dovedit a reduce expresia citokinelor proinflamatorii, cum ar fi IL-4, IL-6, IL-8 și IL-18 (Yoon et al., 2009)

Yoon et al. (2009) au arătat că uleiurile esențiale reduc semnificativ producția de IL-6 și TNF α . În experimentul actual s-a observat că prezența TNF α este redusă în grupul E2 și mai mare în toate celelalte grupuri, ceea ce poate implica faptul că pulberea de turmeric reduce expresia acestora. În concordanță cu rezultatele unui alt studiu (Lu et al., 2014), în care au fost utilizate diverse preparate cu efecte antioxidante. La păsările de curte, expresia ARNm a IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 și a factorului de necroză tumorală superfamilia 15 a fost îmbunătățită în macrofagele de pui tratate *in vitro* cu extract organic de turmeric. Curcumina în aval de mediatorii proinflamatori, cum ar fi IL-1 β , IL-6 și TNF- α . Un studiu anterior (Al-Sadi et al., 2016) a arătat că citokinele proinflamatorii, inclusiv factorul de necroză tumorală TNF- α , IL-1 β , IL-6 și interferon- γ , determină o creștere a permeabilității joncțiunii intestinale și contribuie la procesul inflamator, permițând penetrarea antigenică luminală. Factorul de necroză tumorală

TNF- α , un mediator-cheie al inflamației intestinale, determină o creștere a permeabilității joncțiunii strânse epiteliale intestinale, prin activarea genei kinazei lanțului ușor al miozinei (MLCK; denumirea oficială MYLK3). Este, de asemenea, o citokină pleiotropică care joacă roluri critice în apărarea gazdei și în inflamația acută și cronică. Proteinele din familia de proteine induse de factorul de necroză tumorală TNF-alfa 8 (TNFAIP8/TIPE) sunt cunoscute ca fiind implicate în menținerea homeostaziei imune. Deficiența acestor proteine a crescut nivelul celulelor CD4+ splenice, nivelul citokinelor serice (IL-17A, TNF și IL-6) și expresia caspazei active-3 în intestinul subțire, în timp ce expresia factorului de supraviețuire celulară Ki-67 a fost semnificativ diminuată în celulele epiteliale ale intestinului subțire, sugerând că TNFAIP8 (TNF) ar putea fi implicat în patologia tractului gastrointestinal. Cu toate acestea, funcția exactă a TNFAIP8 în reglarea răspunsului imunitar în bolile inflamatorii cronice este încă necunoscută. Rolul biologic al acestora în modularea inflamației, în modificarea răspunsului imunitar și în reglarea supraviețuirii sau morții celulare pare să depindă de contextul celular și de boală (Yoon et al., 2009). Semnalarea mediată joacă, de asemenea, un rol important în menținerea epiteliului colonic. Semnalizarea promovează proliferarea celulară și repararea rănilor, prin activarea semnalizării epiteliale Wnt/ β -Catenin, care este o cale importantă pentru menținerea arhitecturii vilozităților intestinale/ criptelor (Flanagan et al., 2018). În general, nivelurile ridicate de TNF α sunt induse în timpul inflamației sau al infecției, ceea ce poate perpetua inflamația intestinală. În studiul de față, prin adăugarea pulberii de turmeric în dietă, s-a observat o reducere a prezenței TNF α , ceea ce indică din nou efectele pozitive ale pulberii de turmeric asupra structurii intestinale și, în cele din urmă, asupra întregului organism (Vissek, 1978).

Proteinele Paired box (Pax) 3 și 7 sunt membre ale familiei de gene PAX și sunt importante pentru angajarea celulelor într-o linie miogenică în timpul dezvoltării sau regenerării musculare (Charytonowicz et al., 2014). S-a demonstrat că genele Pax joacă, de asemenea, roluri-cheie în formarea țesuturilor și a organelor în timpul embriogenezei la mamifere (Buckingham & Relaix, 2007). La pui, Pax3 și Pax7 reglează negativ expresia fiecărei gene în dermomiotozul și au roluri esențiale în dezvoltarea somitelor și a membrelor la pui (Galli et al., 2008). Expresia genelor Pax3/7 și MyoD are loc în diferite țesuturi ale păsărilor. În afară de țesuturile musculare scheletice, aceste trei gene sunt exprimate și în inimă, splină, grăsime, creier etc. Ele au roluri de coordonare în inimă, splină și creier, ceea ce este similar cu situația întâlnită în mușchiul scheletic. În plus, modelele de expresie tisulară ale Pax3 și Pax7 prezintă, de asemenea, diferențe în alte țesuturi, cum ar fi țesuturile intestinale (Relaix et al., 2005). La rață, atât Pax3, cât și Pax7 sunt exprimate în mușchiul pieptului, inima, splina, rinichii, intestinul subțire, grăsimea din abdomen, creierul și pancreasul, iar nivelurile de expresie ale acestora sunt

corelate în mod semnificativ, ceea ce indică rolurile suprapuse ale Pax3 și Pax7 la rață (Vorobyov & Horst, 2006). Un epiteliu intestinal mai subțire îmbunătățește absorbția nutrienților și reduce nevoile metabolice ale sistemului gastrointestinal. Subțierea peretelui gastrointestinal s-ar putea datora unei inhibiții a producției microbiene de poliamine și acizi grași volatili, cunoscuți pentru creșterea ratei de reînnoire celulară și a activității enterocitelor (Ferket et al., 2002).

II.3.1. Expresia Nrf2 ȘI P65 la păsări expuse la turmeric

Expresia p65 este foarte intensă în mucoasa cecumului la puii din lotul control și scade în intensitate progresiv de la LE3, LE1 și LE2. Expresia Nrf2 este foarte intensă la LE2 și se reduce la loturile LE3, LE1 și control.

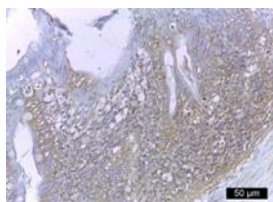


Figura 3.13. Expresia intensă a p65 în mucoasa cecumului la puii din lotul control. Col IHCanti p65 x400

Figure 3.13. Intense expression of p65 in the cecum mucosa of chickens from the control group. Col IHCanti p65 x400

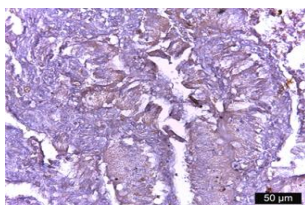


Figura 3.14. Expresia redusă a Nrf 2 în mucoasa cecumului la puii din lotul control.

Figure 3.14. Reduced expression of Nrf 2 in cecum mucosa in control chickens

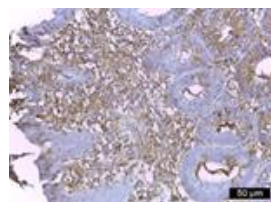


Figura 3.15. Expresia moderat intensă a p65 în mucoasa cecumului la puii din lotul exp 1. Col IHC anti p65 x400

Figure 3.15. Moderate intense expression of p65 in the cecum mucosa of chickens from exp Lot 1. Col IHC anti p65 x400

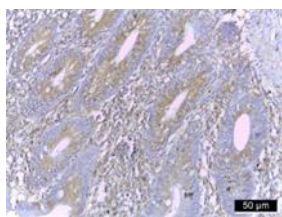


Figura 3.16. Expresia moderată a p65 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 1. Col IHC anti p65 x400

Figure 3.16. Moderate expression of p65 in the cecum mucosa of chickens from exp Lot 1. Col IHC anti p65 x400

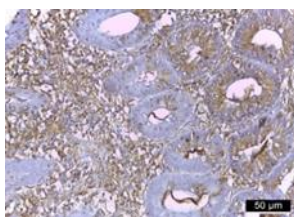


Figura 3.17. Expresia moderată a Nrf2 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 1. Col IHC anti Nrf2x400

Figure 3.17. Moderate expression of Nrf2 in the cecum lining of chickens from exp Lot 1. Col IHC anti Nrf2x400

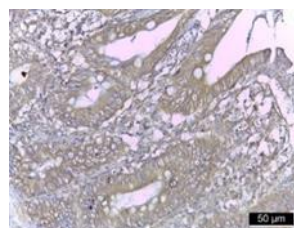


Figura 3.18. Expresia intracitoplasmatică moderată spre intensă a p65 în epitelul mucoasei și vel glandular al cecumului la puii din LE 3. Col anti p65x400

Figure 3.18. Moderate intracytoplasmic expression of p65 in the cecum lining of LE 1 chickens. Col anti p65x400

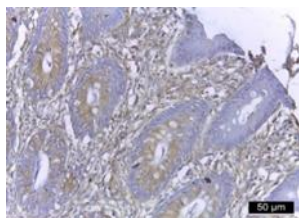


Figura 3.19. Expresia redusă a p65 în mucoasa cecumului la puii din lotul E2. p65

Figure 3.19. Reduced expression of p65 in the mucosa of the cecum of chickens from batch E2. p65

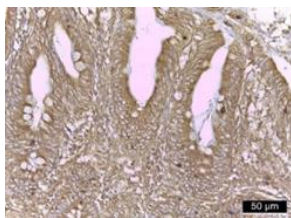


Figura 3.20. Expresia intensă a Nrf2 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 2. Col IHC anti Nrf2x400

Figure 3.20. Intense expression of Nrf2 in the cecum mucosa of chickens from exp batch 2. Col IHC anti Nrf2x400

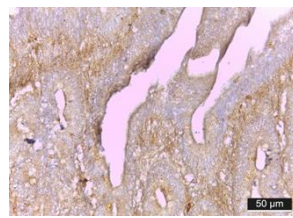


Figura 3.21. Expresia moderată a Nrf2 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 3. Col IHC anti Nrf2x400

Figure 3.21. Moderate expression of Nrf2 in the cecum mucosa of chickens in Batch exp 3. Col IHC anti Nrf2x400

Au fost utilizați anticorpi anti-NRF2 și Nf KB p65. Lamele cu probe de țesut din cecum au fost supuse analizei morfometrice, iar structura microscopică generală a fost tipică pentru fiecare secțiune analizată.

În studiul propriu s-au remarcat aspecte similare ce indică faptul că dozele de 0,5% și 1% turmeric adăugate în dieta puiilor din lotul 1 și 2 au crescut expresia Nrf2. În studiul citat anterior s-a observat de asemenea că dozele mici și medii de turmeric influențează cel mai bine expresia Nrf2 în sens pozitiv.

De asemenea se remarcă faptul că adăugarea de 1% și 2% turmeric reglează expresia p65 în jos, în conformitate cu alte studii citate. Se poate menționa și faptul că o creștere a expresiei Nrf2 duce în același timp la o scădere a expresiei p65. Această legătură dintre Nrf2 și p65 este subliniată în studii pe puii broiler. De asemenea putem menționa faptul că 1% turmeric adăugată în dietă duce la cele mai bune rezultate. Se remarcă cea mai accentuată expresie a Nrf2 și cea mai slabă expresie a P65.

Discuții

Nrf2 (NF-E2-related factor 2), un membru al familiei de factori de transcripție Cap'n'collar (CNC), este format din 605 aminoacizi și este împărțit în șapte domenii funcționale foarte conservate, cunoscute sub numele de Neh1-Neh7. Domeniul N-terminal influențează stabilitatea și ubiquitinarea lui Nrf2 de către regulatorul său negativ Keap1, în timp ce domeniul Neh5 este responsabil pentru localizarea citoplasmatică a lui Nrf2 (Sarmistha et al, 2020). S-a demonstrat că factorul de transcripție Nrf2 este un regulator principal al apărării antioxidante prin activarea diferitelor vitamine și a altor molecule protectoare pentru a menține homeostazia redox în celule/țesuturi (Surai et al, 2021).

Ca principiu, factorul nuclear legat de factorul nuclear eritroid 2 (Nrf2) controlează expresia multor enzime antioxidante. Atunci când celulele se confruntă cu

stresul oxidativ, Nrf2 devine activ, se translocă în nucleu, se leagă de elementele de răspuns antioxidant (ARE) și, astfel, activează genele care codifică enzimele de detoxifiere, cum ar fi SOD. Antioxidanții endogeni neenzimatici includ vitaminele (vitaminele C și E), β -carotenul și glutationul (L-glutamil-L-cisteinilglicină, GSH) care conține o grupare tiol reactivă (sulfhidril). Deși o puternică inducție antioxidantă este legată de Nrf2 atunci când această cale este declanșată de ROS, acest răspuns este limitat deoarece ROS activează, de asemenea, o cale de semnalizare a morții celulare (Shereen et al, 2023). Interesant este faptul că s-a dovedit că Nrf2 contribuie, de asemenea, la reglarea axei heme-oxigenazei-1 (HO-1), care este o țintă antiinflamatorie puternică. Studii recente au arătat o legătură între sistemul Nrf2/elementul de răspuns antioxidant (ARE) și expresia mediatorilor inflamatori, calea NF- κ B și metabolismul macrofagelor. Astfel, Nrf2 face parte dintr-o rețea multistratificată care joacă un rol-cheie în homeostazia redox, precum și în inflamație. Acest lucru sugerează o nouă strategie de proiectare a agenților chimici ca modulatori ai căilor dependente de Nrf2 pentru a viza răspunsul imunitar (Sarmistha et al, 2020). Nrf2 reglează, de asemenea, funcția imunitară intestinală prin afectarea polarizării celulelor T. Activarea Nrf2 inhibă secreția citokinei Th1 IFN γ și a interleukinei (IL)-2 în evenimentele timpurii, promovând apoi diferențierea CD4⁺ Th2 (Puqiao et al, 2020). Prin urmare, suplimentarea cu componente antioxidante exogene orale sau pro-oxidanți, care pot declanșa în mod benefic calea Nrf2, poate contribui la atenuarea stresului oxidativ și a contribuției acestuia la patogeniza stresului termic în intestine (Puqiao et al, 2020).

Curcumina este principala componentă activă a turmericului. În studiul citat s-a constatat că o doză mică de turmeric a protejat celulele de apoptoză. Apoptoza în grupurile tratate cu doze medii și mari de turmeric a stagnat în stadiul incipient. În plus, curcumina în doze medii a crescut expresia Nrf2. Translocarea lui Nrf2 în nucleu pentru a crește expresia hemoxigenazei-1 (HO-1) a fost promovată în grupurile tratate cu doze mici și medii de turmeric. În grupurile cu doze mici și medii, Nrf2 a fost activat și a migrat în nucleu. S-au detectat, de asemenea, nivelurile de ARNm ale Nrf2 și Keap1. Nivelurile de ARNm ale Nrf2 și Keap1 au fost suprimate semnificativ de turmeric în comparație cu grupul de control pozitiv. S-a emis ipoteza că efectul turmericului asupra căii Nrf2-Keap1 este legat în principal de controlul posttranscripțional. Turmericul a redus acumularea de specii reactive de oxigen (ROS), expresia citokinelor inflamatorii TNF- α , IL-8, IL-6 și IL-1 β și rata de apoptoză indusă de LPS. Aceste efecte au fost asociate cu activarea căii factorului nuclear legat de factorul E2 2 (NFE2L2) - elementul de răspuns antioxidant (ARE), cuplată cu inactivarea căilor apoptotice NF- κ B inflamatorii și a caspazei/Bcl2. Aceste rezultate de mai sus au arătat faptul că aceasta ameliorează stresul oxidativ, inflamația și apoptoza induse de LPS (Sureshbabu et al, 2023). În plus față de calea Nrf2, turmericul crește capacitatea antioxidantă prin

modificarea enzimelor antioxidante (de exemplu, CAT, SOD1 și GPX1), împreună cu alte proteine de canal (Sureshbabu et al, 2023). Turmericul a rezistat oxidanților prin creșterea activității enzimelor antioxidante și activarea căii Nrf2-Keap1, care ar putea promova potențial supraviețuirea celulelor (Xinyu et al, 2019). Pe de altă parte, trebuie să menționăm că ROS sunt, de asemenea, cunoscute pentru a activa factorul de transcripție nucleară (NF-κB) din care face parte p65, o proteină de reglementare transcripțională multidirecțională care este strâns legată de diverse procese fiziologice și patologice, cum ar fi stresul oxidativ, inflamația, răspunsul imunitar, proliferarea celulară, transformarea și apoptoza (Shereen et al, 2023).

p65, cunoscut și sub numele de RelA, este una dintre cele cinci componente care formează familia de factori de transcripție NF-κB (factor nuclear kappa-catenă ușoară-întăritor al celulelor B activate). Ca parte a căii de semnalizare NF-κB, p65 este de obicei implicată în răspunsul inflamator al organismului. Această cale poate fi indusă de stimuli stresanți, inclusiv radicalii liberi, iradierea ultravioletă (UV), factorul de necroză tumorală α (TNFα), interleukina 1-beta (IL-1β), modelele moleculare asociate agenților patogeni (PAMP) sau lipopolizaharidele bacteriene (LPS) (Fathi et al, 2018). S-a demonstrat că Nrf2 este strâns legat de NF-κB, responsabil pentru controlul inflamației. Rolurile de reglementare ale NF-κB la păsările de curte sunt încă puțin cunoscute, dar informațiile acumulate indică în mod clar că, la fel ca la mamifere, NF-κB este un regulator principal al multor procese importante, inclusiv al inflamației la speciile aviare (Watanabe et al, 1975). Translocarea nucleară și activarea Nrf2 și NF-κB - actori importanți în reglarea homeostaziei redox (Fathi et al, 2018). Numeroase procese fiziologice cruciale sunt reglementate de NF-κB. Cu toate acestea, s-a demonstrat că activarea excesivă a NF-κB crește riscul de boală, în timp ce suprimarea NF-κB este asociată cu reducerea riscului. Mai precis, ROS sunt generate în celulele epiteliale intestinale de mai mulți factori de stres. ROS perturbă echilibrul redox și provoacă inflamație, prin NO este produs de microbiota intestinală în țesuturile intestinale prin conversia nitriților și nitraților. Producția excesivă de NO din cauza disbiozei generează ROS asociate cu daune celulare, de exemplu, datorită inhibării lanțului respirator mitocondrial al gazdei. Trebuie menționat faptul că leziunile intestinale datorate stresului termic ar putea duce la perturbări ale echilibrului redox și la reacții inflamatorii reglementate prin NF-κB. Se pare că expresia NF-κB la păsările supuse la stres termic depinde de condiții, inclusiv de temperatură, de durata expunerii și de vârsta păsării. În plus, stresul termic a fost, de asemenea, responsabil pentru creșterea semnificativă a expresiei proteinelor antigenului nuclear al celulelor proliferante (PCNA), TLR4 și NF-κB. Autorii din alte studii au arătat efectele antiinflamatorii protectoare ale curcuminei (100 și 200 mg/kg) în grupurile stresate de căldură. În mod similar, la puii cu oase negre expuși la stres termic, s-a demonstrat că

suplimentarea dietei cu resveratrol (400 mg per kg) a îmbunătățit integritatea intestinală și a ameliorat supraexprimarea ARNm a HSP70, HSP90 și NF-κB în a 6-a, a 10-a și a 15-a zi de stres. În condiții de stres la rece, activitatea SOD a scăzut, reflectând o stare de stres oxidativ, în timp ce expresia ARNm a NF-κB a crescut în duoden, jejun și ileon (Watanabe et al, 1975). Există, de asemenea, o serie de publicații care arată efectele protectoare ale suplimentelor fitogene în nutriția păsărilor de curte în diferite condiții de stres. Nrf2 este un factor de transcripție cheie considerat ca fiind principalul regulator al răspunsului antioxidant celular și al metabolismului xenobiotic (Bocci și Valacchi, 2015; Huang et al., 2015). Proteina Keap1 este inhibitorul Nrf2. Acesta este cunoscut ca având de departe cel mai mare rol în reglarea căii de semnalizare Nrf2 (Baird și Dinkova-Kostova, 2011). În special, Keap1, datorită conținutului său ridicat de tioli reactivi, este un senzor redox foarte sensibil care este localizat în apropierea membranei plasmatică, unde întâlnește electrofilele exogene și produsele peroxidării lipidelor (Stefanson și Bakovic, 2014). Cea mai mare parte a Nrf2 în condiții fiziologice sunt sechestrate în citoplasmă de Keap1. Aici sunt ținute pentru degradarea proteazomală permanentă. Atunci când are loc disocierea complexului Keap1-Nrf2 datorită modificării covalente sau oxidării reziduurilor critice de cisteină din Keap1 și/sau activării directe a Nrf2, Nrf2 se translocă în nucleu și se leagă de ARE, ceea ce duce la transcrierea genelor citoprotectoare (Konstantinos C et al, 2019). Conform rapoartelor de mai sus, răspunsul imunitar s-a îmbunătățit atunci când dietele animalelor au fost suplimentate cu produse pe bază de scorțișoară, oregano, turmeric sau cimbru iar răspunsul la stres a fost atenuat, deoarece căile de semnalizare NFκB și MAPKs au fost suprimate. De asemenea a crescut expresia citokinelor antiinflamatorii și prin urmare, nivelurile din sânge ale celulelor imune nespecifice, cum ar fi heterofilele (neutrofile), au fost scăzute, iar producția de limfocite și anticorpi a fost îmbunătățită pentru a se apăra împotriva agenților patogeni invadatori. În esență, cu cât mai puțină energie cheltuită de pui și porci pentru sistemul imunitar nespecific, cu atât mai multă energie este disponibilă pentru creștere și producție. În concluzie, substanțele fitochimice au modulat căile de semnalizare NFκB și/sau MAPKs la pui și porci, dar mecanismele detaliate, inclusiv expresia moleculelor din amonte care implică semnalizarea NFκB și MAPKs, precum și relația dintre antioxidant și antiinflamare, sunt încă în curs de investigare (Huang et al, 2018).

II.4. Cercetări privind reactivitatea țesutului limfoid asociat mucoasei intestinului la turmeric

Plăcile Peyer din jejun au prezentat aglomerări limfoepiteliale mari și rari limfonoduli la lotul control. La celelalte loturi au fost surprinși limfonoduli de diferite

dimensiuni si numeric variabili. Epiteliul de suprafață la lotul martor si LE3 desprins pe alocuri, bariera intestinală fiind compromisă parțial (fig 2.37).

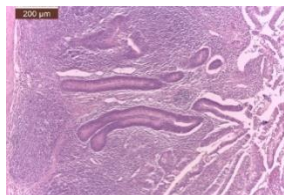


Figura 4.1. Jejun de pui din lotul control. Vilozități intestinale joase cu aglomerări limfoepiteliale în lamina propria și intraepitelial. Spre polul luminal se remarcă desprinderea epitelului columnar. Col HE x100

Figure 4.1. Jejunum of chickens from the control group. Lower intestinal villi with lymphoepithelial clusters in lamina propria and intraepithelial. Towards the luminal pole, detachment of columnar epithelium is noted. HE stain x100

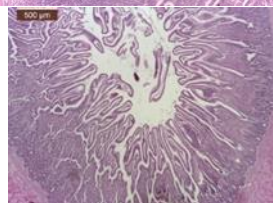


Figura 4.2. Jejunul, placa Payer, la lotul E1 prezintă vilozități mai joase iar în lamina propria aglomerări limfoepiteliale difuze cu rari limfonoduli. Col HEx100

Figure 4.2. Jejunum, Payer plate, in batch E1 shows lower villi and in the lamina propria diffuse lymphoepithelial clusters with rare lymph nodes. HEx100 stain

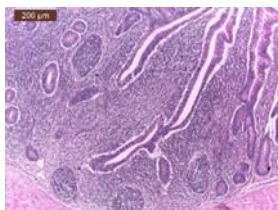


Figura 4.3. Jejun, Placa Peyr la LE2 în care apar aglomerări limfoepiteliale și limfonoduli. Col HE x100.

Figure 4.3. Jejunum, Peyr's plaque at LE2 in which lymphoepithelial clusters and lymph nodes appear. HE x100 stain.

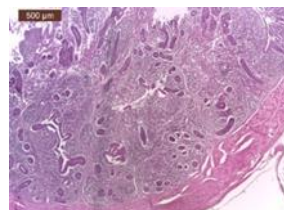


Figura 4.4. Jejun provenit de la LE3. Se remarcă aglomerări limfoide în lamina propria, ruperea barierei epiteliale la polul luminal al mucoasei. Col HE x40

Figure 4.4. Jejun came from LE3. Lymphoid agglomerations in the lamina propria, disruption of the epithelial barrier at the luminal pole of the mucosa. HE x40 staining

Țesutul limfoid de la nivelul amigdalelor cecale de la lotul control este format din aglomerări limfoepiteliale cu un numar foarte mic de limfonoduli care cresc la LE2, LE1, LE3. Integritatea epitelului mucoasei este compromisă la lotul control, însoțită de edem la celelalte loturi modificările sunt mai reduse. La LE2 se evidențiază integritatea barierei epiteliale (fig 2.43).



Figura 4.5. Amigdale cecale provenite de la lotul control.. Vilozitățile intestinale prezintă pe alocuri edem și epitelul columnar desprins Col HE x40.

Figure 4.5. Caecal tonsils from the control group. Lymphoepithelial agglomerations Intestinal villi show

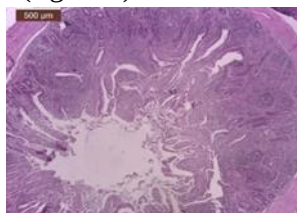


Figura 4.6. Amigdale cecale la LE1. Se evidențiază aglomerări limfoepiteliale și limfonoduli de dimensiuni moderate. Vilozitățile intestinale prezintă pe alocuri epitelul columnar desprins Col HE x40.

Figure 4.6. Cecal tonsil at LE1. Lymphoepithelial clusters and moderate-sized lymph nodes are

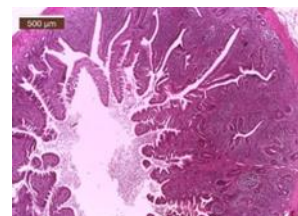


Figura 4.7. Amigdala cecală de la puii din LE2. Aglomerări limfoepiteliale în care se evidențiază și mici limfonoduli. Bariera epitelială de la polul luminal este integră. Col HE x400.

Figure 4.7. Cecal tonsil from LE2 chicks. Lymphoepithelial clusters in which small lymph nodes are evident.

occasional oedema and detached columnar epithelium Col HE x40.

evident. Intestinal villi show detached columnar epithelium in places HE x40 stain

The epithelial barrier at the luminal pole is intact. HE x40 staining.

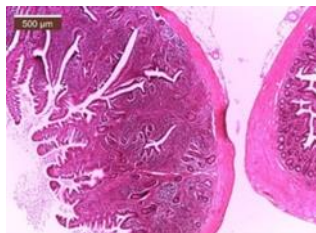


Figura 4.8. Amigdale cecale provenite de la puii din LE3. Aglomerările limfoepiteliale sunt prezente atât în lamina propria cât și în submucoasă, în interiorul lor se observă și limfonoduli mici. Vilozitățile intestinale sunt mai joase cu bariera epitelială integră.

Figure 4.8. Figure 55.Cecal tonsils from LE3 chicks. Lymphoepithelial clusters are present in both the lamina propria and submucosa, and small lymph nodes are observed within them. Intestinal villi are lower with intact epithelial barrier. HE x40 staining

Discuții

La animalele monogastrice mucoasa gastro-intestinală este o linie de apărare împotriva agenților patogeni. Pentru a lupta împotriva agenților infecțioși, în intestin s-a dezvoltat un sistem complex al TLAMD. Acesta cuprinde peste 75% din toate celulele limfoide ale întregului sistem imunitar. Antigenii sunt capturați de celule specializate care prezintă antigenul (APC), care secretă citokine adecvate, determinând astfel dezvoltarea sau atenuarea inflamației (Butler et al, 2013, Uddin et al, 2013).

Tractusul gastrointestinal este bogat în celule mieloide și limfoide, multe dintre acestea rezidând în țesuturile limfoide organizate. TLAMD este un sistem imunologic cheie, structurile asociate formând un loc care promovează colocalizarea numeroaselor tipuri de celule imune necesare pentru inițierea și medierea funcției imune. Multe dintre structurile organizate ale acestuia sunt situsuri de inducție imunitară (Jeurissen et al, 1994) oferind condițiile necesare pentru a induce răspunsuri imune adecvate (Kasahara et al, 1993).

Macrofagele sunt localizate în spațiul subepitelial; ele exprimă antigenul complexului major de histocompatibilitate (MHC) clasa II și conțin fosfatază acidă. Deși vârsta nu influențează modelul de distribuție caracteristic al acestor limfocite totuși numărul de celule crește la păsările mai în vârstă (Jeurissen et al, 1989). O populație eterogenă de leucocite intraepiteliale (IEL) rezidă printre celulele epiteliale. Studiile efectuate la găini cărora li s-a administrat H3-timidină au arătat că IEL reprezintă limfocite care migrează din lamina propria în epiteliu. IELs se găsesc în epiteliul stratificat al esofagului și în epiteliul columnar care căptușește intestinul, dar rareori în epiteliul proventriculului (Jeurissen et al, 1994). Epiteliul care acoperă țesutul limfoid organizat, cum ar fi plăcile Peyer, bursa lui Fabricius și diverticulul lui Meckel, nu este dispus ca în vilozitățile și glandele intestinale. Acest epiteliu se caracterizează prin microvilozități neregulate, numeroși tubuli apicali, vezicule și vacuole și citoplasmă densă. În plus, epiteliul este adesea aplatizat, lipsit de celule caliciforme producătoare de mucus. Celulele conțin fosfatază alcalină, în timp ce epiteliul columnar vilozitar nu

conține fosfatază. Limfocitele pătrund în epiteliu pentru a forma un limfoepiteliu, cu excepția bursei lui Fabricius (Burns et al, 1983)

Dezvoltarea sistemului imunitar asociat intestinului este incompletă la ecloziune și astfel intestinul este colonizat mai rapid cu celule imune decât alte țesuturi imune. Dezvoltarea TLAMD este însoțită de o dezvoltare fizică și funcțională rapidă a tractului gastrointestinal. Enterocitele joacă un rol important în timpul dezvoltării intestinului. Ele cresc în dimensiune și adoptă un fenotip columnar, cu microvilozități definite pe fața luminală a intestinului după eclozare. Diferențierea enterocitelor în celule caliciforme producătoare de mucus are loc la ecloziune, dar numărul acestora crește rapid după aceea. Această proliferare extinsă a enterocitelor este atribuită formării structurilor de bază ale intestinului, cum ar fi stabilirea unității criptă-vilozitate în intestinul subțire. Dezvoltarea TLAMD depinde parțial de prezența microbiotei enterice. Deficiențele nutritive deosebit de dăunătoare pentru dezvoltarea sistemului imunitar includ acidul linoleic, vitamina A, fierul, seleniul și câteva dintre vitaminele B. Au fost raportate niveluri adecvate de seleniu alimentar, nucleotide, acizi grași polinesaturați cu lanț lung și vitaminele A, C și E în modularea apărării gazdei împotriva agenților patogeni infecțioși. Includerea aditivilor furajeri în dieta păsărilor a dus la îmbunătățirea consumului de hrană și a performanțelor de creștere, cu o îmbunătățire a eficienței furajere.

Curcumina (diferuloilmetan), un polifenol natural, este principiul activ al turmericului (*Curcuma longa*) (Fig 3). Curcumina și curcuminozii sunt prezenți în turmeric între 22,2-40,3 mg/g în rizomi și 1,94 mg/g în rădăcini. Aceasta are o structură conjugată unică, incluzând doi fenoli metoxilați și o formă enol de β -dietonă. O modalitate de a consolida apărarea imună a intestinului este utilizarea anumitor promotori de creștere precum probiotice, prebiotice și fitobiotice ca aditivi furajeri. Polifenolii sunt compuși organici din clasa fenolilor, cu mai multe grupări hidroxil legate de un radical aromatic în moleculă. Aceștia pot fi găsiți și în pudra de turmeric, alge (*Spirulina spp.*) cătină, sâmburii și pielețele strugurilor etc. (Al-Sultan, 2003, Bondar et al, 2022, Cesta et al, 2006, Pascariu et al, 2017, Solcan et al, 2013). Administrarea compușilor fenolici precum turmericul poate reduce inflamația intestinală, îmbunătățește digestibilitatea nutrienților și metabolismul. Includerea pudrei din rizomi de turmeric în hrana pentru animale induce acțiuni pozitive asupra parametrilor biochimici din sânge, cum ar fi creșterea activităților enzimelor antioxidante și detoxifiante (Field et al, 2002). Această preocupare globală a dus la dezvoltarea unor progrese remarcabile în imunologie și nutriție în ultimele decenii pentru a face lumină asupra efectului diferitelor substanțe nutritive asupra funcțiilor specifice ale tractului gastro-intestinal, inclusiv asupra răspunsului imunitar și modului în care acestea influențează rezistența gazdei la infecții. Deși, nivelurile adecvate de

nutrienți din alimentația animalelor joacă roluri importante în menținerea unui răspuns imunitar "optim", deficiențele sau chiar aportul excesiv, ar putea avea consecințe negative asupra stării imunitare și a susceptibilității animalelor la o varietate de agenți patogeni. Din punct de vedere nutrițional, sunt necesare substraturi (de exemplu, aminoacizi, energie, cofactori enzimatici) pentru a susține proliferarea limfocitelor indusă de antigeni, recrutarea de noi monocite și heterofile din măduva osoasă, sinteza moleculelor efectoare (de exemplu, imunoglobuline, oxid nitric, lizozim, complement) și a moleculelor de comunicare (de exemplu, eicosanoizi, citokine). Țesutul limfoid asociat tractusului intestinal (TLAMD) în funcție de localizare, este prezent ca agregări de celule limfoide sau sub forma de celule organizate în foliculi limfoizi și amigdale (Solcan et al, 2018). Ca atare, formează o primă linie de apărare împotriva antigenelor dăunătoare care intră în organism în timpul hrănirii și respirației (Brandtzaeg et al, 1984). Există o legătură stransă între dezvoltarea țesutului limfoid, microbiom și dietă. Al-Sultan și col. (2003) au arătat că turmericul a crescut indicele de greutate al organelor limfoide (splina, Bursa lui Fabricius și timusul), ceea ce poate să compenseze involuția organelor limfoide la puii de carne în timpul stresului termic. Având în vedere rolul crucial al organelor limfoide în producerea și maturizarea celulelor imunitare, capacitatea turmericului de a menține dezvoltarea acestor organe este esențială pentru a menține puii sănătoși în condiții de stres termic. Suplimentarea cu curcumină a hranei a scăzut nivelurile de IL-1 β și TNF- α din jejun ($P < 0,05$) și a scăzut continuarea atât conținutul plasmatic, cât și cel jejunal de malonil-dialdehidă (MDA) ($P < 0,01$) (Dorta et al, 2005). Activitatea antiinflamatorie a turmericului este responsabilă de modularea funcțiilor celulelor imunitare ale animalelor. Rezultatele hibridizării microarray au demonstrat că expresia genică a mieloperoxidazei, și lactotransferinei ce sunt asociate cu răspunsul inflamator la pui a fost redusă prin tratamentul cu extract organic de turmeric.

La nivelul cecumului, pe lângă țesuturile limfoide organizate, limfocitele unice și agregatele din lamina propria conțin atât celule B, cât și țesutul limfoid difuz conține în mare parte celule TcR alpha beta CD4+ sau CD8+. Celulele CD8+ din epiteliul cecal reprezintă celule T gamma delta sau celule NK. Limfocitele B care apar în zona subepitelială, în centrele germinale și în număr redus, în epiteliul cecal exprimă predominant fie IgM, fie IgA (Yoo et al, 2020). Un timp atât de scurt de retenție selectează bacteriile care pot adera la stratul mucoasei și/sau se dezvoltă rapid. Cu toate acestea, cele două pungi cecale sunt ideale pentru un microbiom divers care are un efect considerabil asupra nutriției și sănătății gazdei.

Microbiomul cecal este, într-adevăr, cel mai studiat microbiom intestinal al păsărilor de curte (Deng et al, 2014). S-a considerat că microbiota intestinală și metabolismul său de la nivelul intestinului evoluează odată cu vârsta și pot fi legați de

formarea unei structuri intestinale sănătoase. Prin urmare, vârsta afectează componența comunității microbiene și metabolismul acestora de-a lungul tractusului gastrointestinal.

Cercetările anterioare care au folosit animale fără germeni au arătat că greutatea și grosimea peretelui cecumului și a segmentelor intestinului subțire erau mai mici decât cele ale animalelor normale. Microbiota intestinală afectează expresia genei mucinei și tipurile de mucine (Abdelrazeq et al, 2021).

Mai mulți polifenoli activează Nrf2, care, la rândul său, stimulează expresia enzimelor antioxidante (Shereen et al, 2023). Biologia redox este un domeniu al științelor biologice moderne care se dezvoltă foarte rapid, iar rolurile homeostaziei redox în sănătate și boală au primit recent o atenție deosebită. Există o serie de perechi redox în celulele/țesuturile responsabile de menținerea/reglarea homeostaziei redox (Surai et al, 2021). Dezechilibrul stării redox reduce sănătatea, performanța și producția animalelor, având ulterior un impact asupra fezabilității economice. Stresul și inflamația cronică, cunoscute și ca "ucigași secreți" la animale, pot duce la peroxidarea lipidelor, oxidarea și nitrarea proteinelor, deteriorarea ADN-ului și, în cele din urmă, apoptoza. Acest lucru se datorează unui dezechilibru între generarea de radicali liberi și apărarea antioxidantă endogenă, care, la rândul său, posedă un impact dăunător asupra sănătății și performanței animalelor (Shereen et al, 2023).

Studiile pe animale au stabilit că interacțiunile complexe dintre ingredientele dietei, cum ar fi sursele naturale de antioxidanți, microbiomul intestinal, sistemul nervos, sistemul imunitar și sistemul endocrin, sunt esențiale pentru sănătatea metabolică și gastrointestinală. Orice perturbare a acestui echilibru delicat, cum ar fi stresul oxidativ cronic, duce la disfuncție mitocondrială, cu impacturile sale grave asupra sistemului imunitar și a microbiotei. Nouăzeci la sută din problemele patologice sunt legate de inflamația cronică intestinală. În tractul gastro-intestinal, stresul oxidativ și leziunile tisulare care rezultă duc la creșterea permeabilității intestinale. Acest lucru facilitează translocarea toxinelor și a agenților patogeni din tractul intestinal în fluxul sanguin (Shereen et al, 2023).

În condiții de stres oxidativ în intestin, există o cerere de antioxidanți pentru a contracara excesul de ROS; prin urmare, antioxidanții din alimentație pot contribui la reducerea ROS și la îmbunătățirea performanțelor animalelor. Cercetările arată că anumite fitomolecule au proprietăți antioxidante și îmbunătățesc performanța în condiții de stres oxidative (Gaona et al, 2023).

II.4.1 Efectele de stimulare a creșterii în greutate ale turmericului

În acest experiment, suplimentarea dietei cu pulbere de turmeric a influențat, de asemenea, în mod pozitiv creșterea în greutate. Cea mai mare creștere a greutateii corporale a fost observată pentru intervalul 1-14 zile la puii de carne care au primit 0,5%

pulbere de turmeric (LE1). La finalul experimentului, s-a observat că adăugarea a 1% pulbere de turmeric în dietă a avut cele mai bune efecte, ceea ce este în concordanță cu datele din literatură (Mondal et al., 2015).

Tabel 6. Greutatea puilor în perioada experimentală

Table 6. Chicken weight during the experimental period

	Timp (interval de zile)				
	1-14	15-28	1-28	28-42	1-42
Control	302.50±7.04 ^a	776.20±35.51	1079.00±41.70	1590.00±43.20 ^a	2668.70±44.10 ^a
E1 (0,5 % pulbere de turmeric)	358.10±10.64 ^a	920.70±14.34	1279.00±20.73	1720.00±32.00 ^a	2998.80±32.30 ^a
E2 (1 % pulbere de turmeric)	325.40±11.96	811.50±15.35	1137.00±27.19	1800.00±35.20	2936.90±38.40
E3 (2 % pulbere de turmeric)	336.50±8.32	814.80±5.57	1151.00±14.18	1680.00±20.04	2831.30±22.90

a, b, c, d – within a column, means with the same letter differ significantly at 0.05;

Efectele adaosului la diferite niveluri de turmeric (Curcuma longa) asupra câștigului în greutate la puii broiler (mean± standard error)

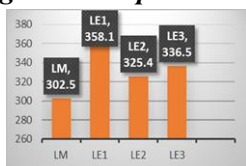


Figura 4.9. Câștigul în greutate (1-14 zile)

Figure 4.9. Weight gain (1-14 days)

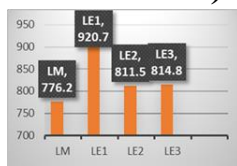


Figura 4.10. Câștigul în greutate (28-42 zile)

Figure 4.10. Weight gain (1-14 days)

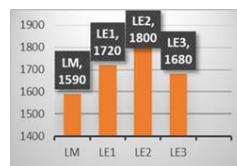


Figura 4.11. Câștigul în greutate (14-28 zile)

Figure 4.11. Weight gain (14-28 days)

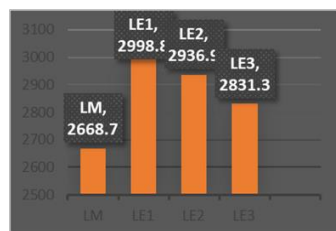


Figura 4.12. Câștigul în greutate (1-42 zile)

Figure 4.12. Weight gain (1-42 days)

Greutatea puilor cea mai bună se observă la LE1 (0,5% turmeric) dar LE2 (1% turmeric) are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative.

Valoarea greutății puilor din LE 1 în ziua 42 a fost de 2989.80±32.30 g.

La finalul experimentului de 42 de zile, 1% turmeric în dietă a dus la cea mai mare greutate corporală.

Discuții

În ultimul timp, nutraceuticele au atras o atenție semnificativă în știința avicolă. Acest lucru este atribuit recunoașterii atributelor nutriționale și de sănătate ale ingredientelor furajere, precum și preocupărilor crescânde cu privire la efectele adverse asociate cu produsele farmaceutice chimice, cum ar fi rezistența la antibiotice și prezența reziduurilor de medicamente (Elnesr et al, 2019, Elnesr et al, 2020). Se știe că utilizarea antibioticelor la păsările de curte reduce încărcătura microbiană din intestin, crescând astfel disponibilitatea nutrienților pentru gazdă (Brisbin et al, 2008). Cu toate acestea, preocupările legate de dezvoltarea rezistenței antimicrobiene și de transferul genelor de rezistență la antibiotice de la animale la microbiota umană au determinat Uniunea Europeană să interzică aplicarea antibioticelor ca promotori de creștere începând cu 1 ianuarie 2006 așa cum s-a mai menționat (Yegani et al, 2008). Eliminarea antibioticelor promotoare de creștere (AGP) din dietele pentru păsări de curte a dus la provocări legate de performanța animalelor și la o creștere a apariției anumitor boli ale păsărilor de curte, cum ar fi enterita necrotică subclinică și disbacterioza (Huyghebaert et al, 2011). În consecință, există o nevoie urgentă de a găsi alternative la AGP. În mod ideal, aceste alternative ar trebui să ofere efecte benefice similare cu cele ale AGP. În ultimii ani, s-a înregistrat o creștere semnificativă a cercetărilor bazate pe nutriție axate pe găsirea de alternative la AGP la diferite animale de fermă, inclusiv la păsările de curte (Rahal et al, 2014).

Nutraceuticele se referă la nutrienții esențiali sau la componentele dietetice derivate de la animale care dețin o valoare nutrițională și farmaceutică semnificativă. Acestea prezintă proprietăți imunomodulatoare și joacă un rol crucial în prevenirea bolilor, promovarea sănătății generale și, ulterior, în creșterea productivității (Dhama et al, 2015, Aronson et al, 2017, Helal et al, 2019, Waheed et al, 2020). În plus, aceste produse nutraceutice ajută la protejarea gazdei împotriva bolilor infecțioase (Cencic et al, 2010), precum și la influențarea și susținerea funcțiilor fiziologice esențiale care contribuie la bunăstarea gazdei (Das et al, 2012).

Creșterea semnificativă a greutății corporale în grupul hrănit cu 0,5% pulbere de turmeric se poate datora activității antioxidante optime a turmericului. Acest nivel ar putea stimula sinteza proteinelor (datorită sistemului enzimatic al păsării). Un studiu a arătat că includerea a 0,5 sau 1% de pulbere de turmeric a dus la o îmbunătățire semnificativă a câștigului în greutate corporală și a indicelui de conversie a hranei în comparație cu grupul de control ($P < 0,05$) (Al-Sultan & Gameel, 2004). Efectul

semnificativ al pulberii de turmeric asupra greutateii corporale în ziua 28 a fost în concordanță cu constatările unui raport anterior (Namagirilakshmi et al., 2010). Aceștia au constatat că includerea turmericului (5 g / kg de hrană) a crescut semnificativ greutatea corporală a puilor. Cu toate acestea, conform aceluiași studiu, în cazul puilor de carne hrăniți cu doze mai mici de turmeric (0,25, 0,50, 0,75 sau 1% în furaje), nu s-a observat nicio schimbare semnificativă în ceea ce privește creșterea greutateii corporale. Un alt studiu a arătat, de asemenea, că puii hrăniți cu turmeric nu au crescut semnificativ în greutate în comparație cu grupul de control (Emadi et al., 2006). Abbas (2010) a observat efecte negative asupra consumului de hrană, a greutateii corporale vii și a indicelui de conversie a hranei atunci când turmericul a fost administrat păsărilor la niveluri de 2,0 g/kg, 5,0 g/kg (Yamauchi et al., 1992), 10,0 g/kg și 30,0 g/kg (Abbas, 2010). Nu se recomandă includerea a mai mult de 50 g/kg de furaj în hrana animalelor, pentru a evita inducerea hiperemiei și infiltrarea parenchimului și a spațiului portal cu celule mononucleare (Al-Sultan & Gameel, 2004). Studiile efectuate pe puii broiler au arătat că suplimentarea cu turmeric în alimentație poate duce la creșterea în greutate și la îmbunătățirea raportului de conversie a hranei (Hussein et al, 2020). S-a constatat că curcumina are potențialul de a reduce producția de acid gastric, ceea ce duce la o creștere a zahărului din sânge eliberat de celulele corpului. Această scădere a nivelului de zahăr din celulele corpului poate induce foamea la pui, ceea ce duce la un consum de hrană semnificativ mai mare și la o creștere a greutateii carcasei într-o perioadă mai scurtă de timp. În plus, deoarece turmericul este ușor disponibil la un cost mai mic, încorporarea acestuia în hrana pentru animale poate contribui la reducerea cheltuielilor generale cu hrana pentru animale (Rahayu et al, 2015). Durrani și colab. (Durrani et al, 2006) au observat o mai bună eficiență a hranei la puii broiler atunci când turmericul a fost inclus în dieta lor la concentrații mai mici, mai exact la 0,5 %. Acest lucru sugerează că, chiar și la niveluri mai mici de suplimentarea, turmericul poate avea un impact pozitiv asupra eficienței furajelor la puii de carne. Cererea tot mai mare de resurse alternative de hrană pentru animale este determinată de factori precum intensificarea concurenței cu alte sectoare agricole pentru terenuri, impactul schimbărilor climatice și nevoia continuă de a îmbunătăți productivitatea și calitatea cărnii. În plus, s-a pus din ce în ce mai mult accentul pe producerea de alimente funcționale inovatoare care utilizează surse ecologice (Bonos et al, 2016).

Nutraceuticele se referă la nutrienții esențiali sau la componentele dietetice derivate de la animale care dețin o valoare nutrițională și farmaceutică semnificativă. Acestea prezintă proprietăți imunomodulatoare și joacă un rol crucial în prevenirea bolilor, promovarea sănătății generale și, ulterior, în creșterea productivității (Dhama et al, 2015, Aronson et al, 2017, Helal et al, 2019, Waheed et al, 2020). În plus, aceste produse nutraceutice ajută la protejarea gazdei împotriva bolilor infecțioase (Cencic et

al, 2010), precum și la influențarea și susținerea funcțiilor fiziologice esențiale care contribuie la bunăstarea gazdei (Das et al, 2012).

Aminoacizii (Ghoreyshi et al, 2019), mineralele (Khatun et al, 2019) și vitaminele (Ahmad et al, 2019) joacă un rol semnificativ ca și componente comune în dietele pentru păsări de curte, fie individual, fie în combinație (Moghaddam et al, 2014, Horváth et al, 2019) și pot fi considerate produse nutraceutice cu o importanță deosebită în alimentația păsărilor de curte. În timp ce furajele naturale furnizează, în general, nutrienți esențiali pentru păsările de curte, anumiți aminoacizi cruciali (lizină, metionină, treonină și triptofan), vitaminele și mineralele sunt adesea suplimentate sintetic (Ravindran et al, 2013). Forma rafinată a acestor constituenți nutraceutici din alimentație poate duce la îmbunătățirea digestiei, absorbției, utilizării și metabolismului, ceea ce duce în cele din urmă la efecte benefice asupra sănătății în comparație cu formele convenționale. Valoarea nutraceutică și eficiența conversiei la păsările de curte sunt supuse influenței mai multor factori, cum ar fi potențialul genetic al păsărilor, condițiile de mediu, calitatea dietei și sănătatea intestinală. Luarea în considerare a acestor factori este crucială pentru maximizarea eficienței productive a păsărilor (Rinttilä et al, 2013, Sugiharto et al, 2016, Yadav et al, 2019).

Adăugarea a 0,25, 0,5 și 0,75 % de TRP în dieta puilor broiler sacrificați la vârsta de 49 de zile a dus la o reducere semnificativă a grăsimii abdominale (Emadi et al, 2006). Mecanismul care stă la baza reducerii grăsimii prin ingestia de TRP este atribuit efectului său inhibitor asupra speciilor reactive de oxigen ale enzimelor, cum ar fi lipoxigenazele, care joacă un rol în procesele de adipogeneză (Hewlings et al, 2017). Calea lipoxigenazelor este cunoscută ca fiind cea care contribuie la inflamarea țesutului adipos în modelele animale legate de obezitate. Izoformele lipoxigenazei sunt produse în principal de celulele non-adipoase și prezintă modele de traducere distincte în țesuturile grase subcutanate și omentale la om (Dobrian et al, 2011).

S-a demonstrat că turmericul, în special curcumina, compusul său activ, are efecte hepatoprotectoare împotriva diferitelor substanțe toxice la șoareci, șobolani și rațe, inclusiv tetraclorura de carbon, aflatoxina B și ciclofosfamida (Eevuri et al, 2013). Curcuminoidul a demonstrat, de asemenea, un efect protector împotriva aflatoxinei B1.

Neconcordanțele în ceea ce privește efectul turmericului asupra greutateii, observate în diferite studii, pot fi atribuite mai multor factori, inclusiv variațiile în condițiile experimentale, doza de turmeric, durata suplimentării și prezența altor variabile care nu au fost controlate sau luate în considerare în analiza statistică. Este important să se ia în considerare acești factori și să se efectueze cercetări suplimentare pentru a înțelege mai bine impactul suplimentării cu turmeric asupra greutateii ficatului la pui de carne.

II.4.2. Impactul suplimentării cu turmenic asupra greutateii corporale și a consumului de furaje

Tabel 7. Consumul de hrană al puilor

Table 7. Feed consumption of chicks

Consumul de hrană	Lot martor-dieta de bază	Dieta de bază +0,5% turmeric	Dieta de bază +1% turmeric	Dieta de bază +2% turmeric
Dieta starter 1-7 zile	0,150 kg	0,110 kg	0,130 kg	0,140 kg
Dieta starter 8-14	0,450 kg	0,390 kg	0,410 kg	0,440 kg
Dieta de creștere 15-21 zile	0,950 kg	0,900 kg	0,910 kg	0,940 kg
Dieta de creștere 22-28 zile	1,650 kg	1,500 kg	1,400 kg	0,1600 kg
Dieta de finisare 29-42 zile	2,500 kg	2,300 kg	2,000 kg	2,400 kg

În cercetările anterioare, turmericul a fost utilizat pe scară largă la puii de carne comerciali și la găinile ouătoare, producând rezultate semnificative.

Tabel 8. Indicele de conversie al hranei la puii broiler expusi la curcuma

Table 8. Feed conversion index of broiler chickens exposed to turmeric

Forma de administrare	Doză	Efect	Sursă
Pulbere de turmeric	1%	Îmbunătățirea utilizării furajelor și creșterea în greutate	118
Pulbere de turmeric	0.5%	Creșterea randamentului carcasei la pui	145
Curcumina	200mg/kg	Îmbunătățirea performanțelor de creștere, a modelelor comportamentale și a imunității păsărilor	137

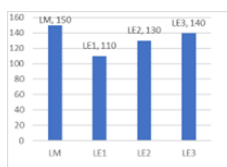


Figura 4.13. Consum hrană/pui 1-7 zile

Figure 4.13. Feed consumption/chicken 1-7 days

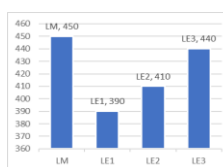


Figura 4.14. Consum hrană 8-14 zile

Figure 4.14. Feed consumption/chicken 8-14 days

Consumul mediu de hrană în **primele 7 zile** de viață este mai scăzut cu 36% atunci când în dietă s-a adăugat turmeric în proporție de 0,5%. De asemenea consumul hranei este mai scăzut cu 15% prin adaosul de 1% turmeric față de lotul martor. Prin

adăgarea turmericului în proporție de 2% în dietă consumul hranei a fost cu 7% mai scăzut.

În perioada 8-14 zile consumul de hrană prin adaosul de 0,5 % turmeric a scăzut cu 15 % iar prin adăugarea de 1 % turmeric s-a ajuns la o scădere a consumului de hrană cu 9% iar când puii au consumat 2 % turmeric în dietă consumul de hrană a scăzut cu 2%.

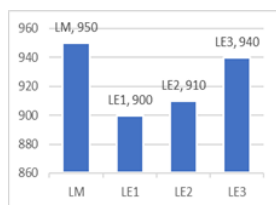


Figura 4.15. Consum hrană 15 -21 zile
Figura 4.15. Consum hrană 15 -21 zile

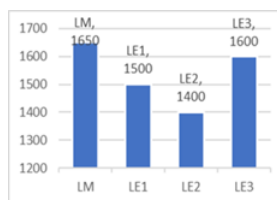


Figura 4.16. Consum hrană 22-28 zile
Figure 4.16. Feed consumption 22-28 days

În intervalul 15-21 de zile consumul de hrană a scăzut cu 5% prin adaosul de turmeric în proporție de 0,5%. De asemenea prin adăugarea de 1 % turmeric în dietă consumul hranei a scăzut cu aproape 10 % iar prin adăugarea de 2 % pulbere de turmeric, consumul de hrană a scăzut cu 1%.

Se poate observa deja, cum în a doua perioadă de creștere adaosul de 1% turmeric are efectele cele mai bune desi în prima perioadă de creștere adaosul de 0,5% turmeric a dat rezultatele cele mai bune și chiar mai ridicate. Bineînțeles totul trebuie privit cu prudență întrucât creșterea puilor este mai ridicată în prima perioadă de dezvoltare.

În perioada 22-28 de zile prin adaosul de 0,5% turmeric în hrana puilor consumul de hrană a scăzut cu 11% , prin adaosul de 1% turmeric în dietă consumul de hrană a scăzut cu 17% și prin adaosul de 2% consumul hranei a scăzut cu 3%.

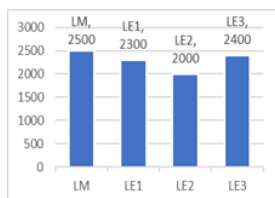


Figura 4.17. Consum hrană 29-42 zile
Figure 4.17. Feed consumption 29-42 days

În perioada 29-42 zile de viață, consumul mediu de hrană a scăzut prin adaosul de 0,5 % turmeric cu 8%, prin adăgarea de 1 % turmeric consumul de hrană a scăzut cu 12,5 % iar atunci când s-a adăugat 2 % turmeric consumul a scăzut cu 4 %.

Cantitatea de hrană consumată influențează indicele de conversie al hranei. În cadrul experimentului actual: FCR=cantitatea de hrană consumată/greutatea puilului.

Tabel 9. FCR lot control

Table 9. FCR batch control

Perioada	Temperatura	Consum/greutate
1-7 zile	30-31 C	150 g furaj/pui 115 g
28-42 zile	21-24 C	2500 g furaj/pui 1590 g

FCR (1-7 zile)=1,30

FCR(28-42 zile)=1,57

Tabel 10. FCR LE 1

Table 10. FCR LE 1

Perioada	Temperatura	Consum/greutate
1-7 zile	30-31 C	110 g furaj/pui 131 g
28-42 zile	21-24 C	2300 g furaj/pui 1720 g

FCR (1-7 zile)=0.83

FCR(28-42 zile)=1.33

Table 11. FCR LE2

Tabel 11. FCR LE2

Perioada	Temperatura	Consum/greutate
1-7 zile	30-31 C	130 kg furaj/pui 127 g
28-42 zile	21-24 C	2000g furaj/pui 1800 g

FCR (1-7 zile)=1.02

FCR(28-42 zile)=1.11

Tabel 12. FCR LE3

Table 12. FCR LE3

Perioada	Temperatura	Consum/greutate
1-7 zile	30-31 C	150 kg furaj/pui 123 g
28-42 zile	21-24 C	2400 g furaj/pui 1680 g

FCR (1-7 zile) =1.21

FCR (28-42 zile) =1.42

Media indicelui de greutate a puilor nesexați de 42 de zile este de 1.76. Prin urmare se poate concluziona foarte ușor faptul că adaosul de turmeric în dietă are efecte pozitive asupra producției de pui ducând la un indice de conversie al hranei mai scăzut. Indicele de conversie al hranei este mai bun la loturile la care dieta puilor a fost suplimentată cu doze mici și medii de turmeric. Dozele mari au efecte negative.

Discuții

Nouzarian și colab. (Nouzarian et al, 2011) nu au constatat, de asemenea, niciun efect semnificativ asupra consumului zilnic de hrană și a creșterii în greutate corporală la pui. Kumari et al. au observat că suplimentarea cu 7,5 g/kg de pulbere de curcuma în hrana pentru animale a dus la cea mai mare creștere în greutate la păsări. Variațiile în valorile greutății corporale ar putea fi atribuite diferențelor în condițiile agroclimatice (Mehala et al, 2008). Ahlawat și colab. (Arslan et al, 2017) au raportat că suplimentarea cu 3,3, 6,6 și 10 g/kg de pulbere de turmeric la puii de carne a îmbunătățit eficiența hranei, ceea ce este în concordanță cu constatările susținute de Kafi și colab. (Kafi et al, 2017). Arslan și colab. (Arslan et al, 2017) au constatat că suplimentarea cu turmeric în diferite rate a îmbunătățit eficiența conversiei furajelor, cel mai bun rezultat fiind

observat la o rată de suplimentare de 1,5 %. Shohe et al. (Shohe et al, 2019) au observat, de asemenea, că eficiența conversiei furajelor a fost cea mai scăzută în grupul suplimentat cu 7,5 g de pulbere de turmeric/kg de furaj, urmat de grupurile suplimentate cu 5, 2,5 și 1,5 g/kg de pulbere de turmeric.

Pulberea de turmeric (TRP) a demonstrat efecte pozitive asupra performanței de creștere, precum și în reducerea stresului oxidativ și îmbunătățirea sănătății intestinale a păsărilor de curte (Hafez et al, 2022, Al-Sultan et al, 2003). În plus, prezența curcuminei, componenta activă din turmeric, în dieta puiului poate avea potențiale beneficii pentru sănătatea oamenilor care consumă carnea, inclusiv efecte antiinflamatorii și antioxidante (Daneshyar et al, 2018). Prin urmare, încorporarea pulberii de turmeric în dieta puilor poate spori eficiența, sănătatea și calitatea cărnii produse (Laganá et al, 2019). Acest lucru oferă, de asemenea, informații valoroase despre impactul potențial al turmericului asupra sănătății umane.

Pe de altă parte, adăugarea a 0,75% de turmeric în hrana pentru animale a crescut câștigul în greutate și a îmbunătățit indicele de conversie al hranei (FCR) la puii de carne comerciali, ceea ce a dus în cele din urmă la creșterea profitului brut (Sugiharto et al, 2011). În plus, s-a demonstrat că încorporarea turmericului în alimentație îmbunătățește performanța de creștere și producția de ouă a păsărilor de curte datorită efectelor sale antibiotice naturale (Mondal et al, 2015). În plus, suplimentarea cu turmeric îmbunătățește capacitatea antioxidantă, FCR și caracteristicile carcasei la puii de carne (Durrani et al, 2006). În plus, includerea a 3% TRP în hrana pentru puii de carne a dus la cel mai mic consum de hrană, îmbunătățind în același timp și alte măsuri de performanță (Xie et al, 2019).

Nivelurile ridicate de producție și conversia eficientă a furajelor reprezintă obiectivul creșterii moderne a puilor de carne. Acest lucru a fost împiedicat în mare măsură de costul ridicat al furajelor. Se cunoaște deja că hrana reprezintă aproximativ 60% din costul variabil în producția de pui (Ahiwe et al., 2018). Un management nutrițional eficient este necesar pentru îmbunătățirea producției și a sănătății păsărilor de carne (Kafi A et al, 2017).

Kamdev et al. (2016) au arătat că la puii broiler cărora li s-a administrat turmeric la un nivel de 5 și 10 g/kg în hrană timp de 42 de zile, rata de creștere s-a mărit cu 18% și, respectiv, 20%, în comparație cu cei cărora li s-a oferit turmeric la 0 g/kg în dietă. De asemenea Durrani et al. (2006) a constatat o mărire cu 12% a ratei de creștere a puilor broiler hrăniți cu turmeric la un nivel de 5 g/kg de hrană timp de 35 de zile. În cadrul aceluiași test de hrănire, autorii au observat o reducere cu 33% a ratei de conversie a hranei (FCR). Constatări similare au fost documentate la puii de carne hrăniți cu diete pe bază de turmeric (AL-Sultan, 2003).

Disparitatea indicilor de performanță a creșterii la puii de carne cu turmeric în alimentație ar putea fi atribuită raselor utilizate, nivelului de suplimentare, duratei de suplimentare, printre alți factori cunoscuți pentru a influența productivitatea puilor de carne (Ogbuewu et al., 2020). În prezent, nu s-a făcut nicio încercare sistematică de a determina influența acestor factori asupra rezultatelor de producție ale puilor broiler hrăniți cu diete suplimentate cu diferite niveluri de turmeric, folosind date din studii publicate anterior. O modalitate posibilă de agregare a rezultatelor studiilor publicate este meta-analiza (Ressing et al., 2009). Meta-analiza este o tehnică statistică avansată care utilizează o abordare cantitativă pentru a sintetiza constatările rezultate din rezultatele mai multor investigații individuale care au abordat aceeași întrebare de cercetare. Ea poate rezolva rezultatele contradictorii ale studiilor, deoarece acest instrument ia în considerare în mod sistematic sursele de eterogenitate dintre studii atunci când este pus mână în mână cu revizuirile convenționale.

Meta-analiza mărește, de asemenea, dimensiunea eșantionului, ceea ce duce la o putere statistică sporită, deoarece rezultatele mai multor studii primare combinate în metaanaliză utilizează în mod normal eșantioane de dimensiuni mici, ceea ce îngreunează detectarea efectului real al unei intervenții (Button et al., 2013). Mai mulți autori au examinat efectul suplimentării cu turmeric asupra performanțelor de creștere la puii broiler (Durrani et al., 2006, Emadi și Kermanshahi, 2006, Nouzarian et al., 2011, Akbarian et al., 2012, Kamdev et al., 2016). Cu toate acestea, niciunul nu a documentat efectul dietelor cu sau fără suplimentarea cu turmeric asupra performanței de creștere a puilor broiler folosind o abordare meta-analitică. Pentru a acoperi lacuna de cunoștințe observată, meta-analiza din studiul citat are ca scop să furnizeze informații bazate pe dovezi privind efectul dietelor cu sau fără suplimentarea cu turmeric asupra consumului de hrană, a indicelui de conversie a hranei și a câștigului mediu zilnic la puii broiler. Rezultatele acestei meta-analize au arătat că majoritatea studiilor au fost efectuate între 2012 și 2019. Această observație poate fi legată de apelul global al cercetătorilor de a utiliza suplimente alimentare naturale ecologice ca alternativă la promotorii de creștere cu antibiotice în hrana animalelor.

Rezultatele estimării cumulate au arătat că suplimentarea cu turmeric a avut un impact mediu asupra raportului de conversie a hranei și a câștigului mediu zilnic la puii de carne, dar un impact mic asupra consumului de hrană. Rezultatele sugerează, de asemenea, că suplimentarea cu turmeric la 0,2-11 g/kg de furaje a îmbunătățit indicele de conversie a furajelor și câștigul mediu zilnic cu o cantitate minimă de furaje (Ogbuewu I.P. et al, 2022).

Îmbunătățirea în performanțele de creștere datorită suplimentării cu turmeric a fost atribuită proprietăților benefice ale substanțelor fitochimice din acesta, care posedă proprietăți antimicrobiene, antifungice și activități antioxidante la puii de carne care pot

îmbunătăți utilizarea nutrienților din dietă. Pe de altă parte, au existat unele rapoarte care arată că turmericul a avut capacitatea de a de a stimula sistemul digestiv, cum ar fi stimularea activităților intestinale precum și secreția pancreatică enzimatică a lipazei, amilazei, tripsinei și chimotripsinei. Recent, suplimentarea dietei cu turmeric a crescut lungimea și lățimea vilozităților în duoden, jejun și cecum la puii de carne. Prin urmare, există o posibilitate de a îmbunătăți performanța creșterii datorită unei suplimentări cu turmeric la puii de carne, iar acest lucru se datorează și îmbunătățirii fiziologiei sistemului digestiv. Raportul mediu de conversie al hranei (FCR) în diferite grupuri de tratament (T0, T1, T2, T3, T4 și T5) a fost de $1,67 \pm 0,005$, $1,55 \pm 0,002$, $1,52 \pm 0,017$, $1,47 \pm 0,005$, $1,55 \pm 0,003$ și respectiv $1,56 \pm 0,003$. Un indice de conversie a hranei mai mic a fost observat la T3 și cel mai mare la T5, comparativ cu lotul de control iar rezultatul a arătat că utilizarea turmericului și a ghimbirului în hrana pentru puii de carne a avut un efect semnificativ pozitiv ($p < 0,05$) asupra indicelui de conversie al hranei. Cel mai eficient indice de conversie al hranei (FCR) a fost constatat în grupul T3 (0,50% turmeric). Constatările prezentului studiu sunt în concordanță cu rezultatul studiilor coordonate de Durrani et al.1, Kumari et al. și Ademola et al. Turmericul din dietă a avut un efect pozitiv asupra performanțelor puilor de carne.

Păsările din grupul de control (T1) au primit rația standard starter pentru pui de carne (0-21 zile) și rația de finisare (22-42 zile). Păsările din celelalte trei grupuri au primit, de asemenea, aceeași dietă, dar suplimentată cu pudră de turmeric în proporție de 2,5 (T2), 5,0 (T3) și 7,5 (T4) g/kg hrană.

Din analiza datelor, s-a observat că aportul total de hrană pe toată perioada de experimentului pentru T1, T2, T3 și T4 au fost de 4,572, 4,566, 4,545 și, respectiv, 4,522 kg per pasăre iar valorile corespunzătoare pentru consumul mediu de hrană au fost de 0,762, 0,761, 0,758 și 0,754 kg/pasăre/săptămână. Aportul mediu de hrană a fost semnificativ ($P < 0,05$) mai mic în grupul T4 urmat de T3, T2 și cel mai mare în grupul T1; cu toate acestea, nu a existat nicio diferență semnificativă de valori între grupul T1 și T2 și între grupul T2 și T3. Suplimentarea cu pulbere de turmeric în hrana pentru puii de carne în grupurile tratate a arătat un consum redus de hrană în comparație cu lotul martor și constatările au fost bine coroborate cu observația de Hussein (2013); Kafi et al. (2017); Arslan et al. (2017). Diferențele dintre observații s-ar putea datora faptului că există variații în ceea ce privesc speciile de păsări de carne și agro condițiile climatice. Din examinarea datelor, s-a observat că eficiența medie a conversiei furajelor (FCE) la puii de carne din diferite grupuri la sfârșitul celei de-a șasea săptămâni a fost înregistrată ca fiind de 1,78, 1,73, 1,70 și 1,63 pentru T1, T2, T3 și T4. respectiv T4. Valorile pentru conversia hranei a fost semnificativ ($P < 0,05$) mai mică în grupul T4 urmată de T3, T2 și cea mai mare în grupul T1. A fost evident că suplimentarea cu pudră de turmeric în proporție de 7,5g/kg de furaj a fost mai bună ca comparativ cu 5g sau

2,5g pe kg de furaj referitpr la eficiența conversiei hranei la puii broiler. Din analiza datelor, s-a constatat că observat că nu a fost înregistrată mortalitate în prezentul studiu. Valorile pentru indicele de performanță pentru grupurile T1, T2, T3 și T4 au fost de 281,53, 314,78, 336,58 și, respectiv, 353,71. Valorile indicelui de performanță al puilor broiler au fost ($P<0,05$) cele mai mari în grupul T4 (353,71), urmat de T3, T2 și cel mai mic în T1. Indicele de performanță mai mare a fost observat la grupul T4 și ar putea fi datorat efectului combinat al unei mai bune greutate corporale și a eficienței conversiei furajelor comparativ cu celelalte grupuri de tratament. Constatări similare au fost raportate de Mondal et al. (2015); Arslan et al. (2017) care au observat, de asemenea, că adăugarea de pulbere de turmeric în hrana pentru animale a îmbunătățit performanța generală a puilor de carne (Shohe Ali et al, 2022)

În acord cu studiile din domeniu și mai ales cu cele citate anterior, în experimental propriu, prin adaosul de turmeric în dieta păsărilor s-a observat o reducere a indicelui de conversie al hranei (FCR).

II.4.3. Concluzii parțiale

1. Valoarea nutraceutică a turmericului este recunoscută atât în medicina umană cât și în medicina veterinară. Din cauza interzicerii antibioticelor s-a testat potențialul turmericului ca stimulator de creștere, pe 3 loturi experimentale la care s-a administrat 0,5%, 1% și 2% turmeric în dietă.

2. Prin adaosul de turmeric în dieta puilor, înălțimea vilozităților duodenale se observă la lotul al doilea (1% turmeric) iar ea mai mică valoare la lotul control. Dintre loturile experimentale cea mai mică valoare a înălțimii vilozităților s-a observat la LE3.

3. Valorile adâncimii criptelor cele mai mari le identificăm la LE3 (2% turmeric). Cele mai mici valori sunt la LE2 (1% turmeric). LE1 (0,5%) are o valori apropiate de cele ale lotului control.

4. Cel mai bun raport înălțime vilozitate: adâncime criptă se observă la LE2. Cel mai slab raport dintre toate loturile se observă la LE3.

5. Diametrul vilozităților cel mai mare la baza acestora se remarcă la LE3 iar cel mai mic diametru la LE1.

6. În ceea ce privește consumul de furaje, cea mai scăzută cantitate consumată s-a obținut prin adaosul de 0,5% turmeric în dieta puilor în prima perioadă de creștere cu valori de 110g în primele 7 zile, 390g între 7 și 14 zile și 900g până în ziua 21.

7. Între ziua 22 și 42 cea mai scăzută cantitate de hrană consumată s-a obținut la lotul al doilea cu valori de 1400g până în ziua 29 iar până în ziua 42, 2000g.

8. Cel mai mic indice de conversie al hranei s-a observat la LE2 prin adaosul de turmeric în proporție de 1% în dieta puilor.

9. Greutatea puilor cea mai bună se observă la LE11 (0,5% turmeric) dar LE2 (1% turmeric) are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative. Valoarea greutateii puilor din LE1 în ziua 42 a fost de 2989.80 ± 32.30 g.

10. Din punct de vedere economic cel mai avantajos este să se adauge 1% turmeric în dietă pentru creșterea greutateii corporale întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici dintre loturile experimentale.

11. Din punct de vedere al reactivității imune la nivel intestinal, în acest experiment, s-a observat o colorație pozitivă pentru IL-6 în grupurile de control și E3, sugerând existența unui proces inflamator. Pulberea de turmeric a redus inflamația, astfel că la LE1 și LE2, imunocolorația a fost negativă pentru IL-6. Prezența TNFAPI8 este mai intensă în grupurile de control. Prezența TNF alpha este mai intensă și la LE1. Prezența TNFAPI8 este moderată în lotul experimental 3. De asemenea colorația Pax-7 este pozitivă. IL-6 este pozitivă în LE 3. Adăugarea de doze mici și medii de turmeric duce la creșterea cea mai însemnată a expresiei Nrf2.

12. Adăugarea de 1% turmeric în dieta puilor broiler din LE2 a dus la creșterea cea mai însemnată a expresiei Nrf2.

13. Adăugarea în dieta păsărilor din LE2 de 1% turmeric duce la reducerea cea mai semnificativă a expresiei p65 și creșterea cea mai accentuată a expresiei Nrf2 în cecum. Adăugarea de 1% și 2% turmeric în dieta puilor din LE2 respectiv LE3 a dus la scăderea accentuată a expresiei p65 la nivel cecal.

14. Există o legătură în cadrul proceselor de oxido reducere între creșterea expresiei Nrf2 și scăderea expresiei p65 la nivel intestinal.

15. Ținând cont de particularitățile morfologice, reactivitatea țesutului limfoid, indicii de conversie al hranei scăzut, de consumul hranei în cea mai redusă cantitate și de greutatea puilor, concluzionăm că la sfârșitul perioadei de creștere adaosul de 1% turmeric în dietă a dus la cele mai bune rezultate chiar dacă în primele 14 zile de viață adaosul de 0,5% turmeric în hrană a dus la rezultate semnificativ mai bune.

16. Adaosul de 2% turmeric în hrană, la finalul perioadei experimentale, are efecte negative asupra indicatorilor mai sus menționați cu excepția adâncimii criptelor. Ceilalți indicatori au valori similare cu lotul control, astfel încât nu se justifică din punct de vedere economic adaosul de 2% turmeric.

II.5. EVALUAREA HISTOLOGICĂ, IMUNOHISTOCHIMICĂ ȘI A RATEI DE CONVERSIE A FURAJELOR DUPĂ EXPUNEREA GĂINILOR OUĂTOARE LA ZOOBIOR2 PE BAZĂ DE SPIRULINA PLATENSIS

Spirulina platensis este o microalgă cu activitate biologică antioxidantă, imunomodulatoare și antiinflamatoare, iar în prezent este utilizată pentru a produce

suplimente nutritive bogate în proteine, acizi grași esențiali, vitamine și minerale. Studiul de față își propune să demonstreze impactul produsului ZooBioR (obținut din *Spirulina platensis*) asupra sănătății, și în special asupra histologiei duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la găinile ouătoare, în prima perioadă tehnologică de ouat. ZooBioR2 este un preparat complex natural constituit dintr-o combinație de extracte de compuși biologic activi derivați din cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Acesta conține aminoacizi liberi și oligopeptide (4,5 – 10%), proteine (45 - 50%), polizaharide (15-20%), fosfolipide (până la 0,25%), seleniu (25 - 50mcg) și zinc (2,5-5mg). Experimentul a fost realizat pe 5 loturi de găini (de 14 păsări/grup). În 4 grupuri din 5, hrana a fost suplimentată cu ZooBioR2 (ZBR2) în doze diferite (5; 10; 15 și 20 mg de substanță activă/kg de furaj). Includerea în alimentație a ZBR2 au determinat o scădere a înălțimii vilozităților intestinale și a scăzut adâncimea criptelor. Scăderea adâncimii criptelor este un indicator al unei rate mai mari de turn-over a țesutului epitelial. Grosimea stratului muscular al duodenului și al cecumului a fost semnificativ mai mică în grupurile experimentale decât în cele de control. Aceste modificări morfologice ale mucoasei intestinale ar putea fi implicate într-o digestibilitate mai bună a furajelor.

II.5.1. Material și metode

Experimentul a fost realizat într-o fermă de găini ouătoare. Obiectivul cercetării a fost axat pe studiul suplimentului nutrițional – ZooBioR2 (ZBR2), precum și pe influența acestui remediu asupra găinilor ouătoare tinere. ZBR2 este un remediu natural complex care conține compuși biologic activi derivați din cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis* (SP). Acesta conține: aminoacizi, inclusiv cei imunoactivi liberi și ca părți componente ale peptidelor și proteinelor; polizaharide; polizaharide sulfatate; fosfolipide și oligoelemente zinc și seleniu (Rotaru, 2016, Rudic et al, 2004). Cercetările au fost efectuate timp de 60 de zile, pe 70 de găini ouătoare de 23 de săptămâni din hibridul Braun-Nic, împărțite în 5 loturi, fiecare cu câte 14 păsări. Păsările incluse în cercetare au fost analoge din punct de vedere al vârstei, stării fiziologice, provenienței, greutatei corporale, fiind cazare în aceeași hală, cu aceleași condiții de mediu și supraveghere veterinară. Pe parcursul experimentului păsările au fost monitorizate și evaluate din punct de vedere al stării de sănătate. Totodată, obiectivul cercetării a fost evaluarea efectului produsului ZBR2, administrat la păsări, asupra morfologiei mucoasei intestinale. Produsul ZBR2 a fost administrat în doze diferite, conform schemei experimentale, din tabelul următor.

Tabel 13. Protocolul de administrare a ZBR2

Table 13. ZBR2 management protocol

Lotul	Nr. păsări	Mod de administrare	Doza, mg/kg furaj
Martor	14	-	-
Experimental 1	14	Zilnic, per os în furaj	5
Experimental 2	14		10
Experimental 3	14		15
Experimental 4	14		20

Dietă găini ouătoare- Furaj Nutrisoya

Produsul conține: porumb, grau, srot soia proteina 46%, srot floare proteina 35%, premix, fosfat monocalcic, carbonat de calciu, fosfor, sodiu.

Tabel 14. Dietă găini ouătoare- Furaj Nutrisoya

Table 14. Laying hens diet - Nutrisoya feed

Proteină brută	16%
Grăsime brută	2,5%
Fibră brută	3,9%
Cenușă brută	12,4%

Pentru a evalua starea de sănătate, la începutul experimentului și ulterior, păsările au fost examinate clinic. La sfârșitul experimentului, găinile au fost eutanasiate prin dislocare cervicală. Probele de țesut din duoden, jejun, ileon și cecum de la toate loturile experimentale și de la lotul martor au fost supuse analizei morfometrice, după fixarea cu formaldehidă 4%, includerea în parafină și colorarea cu hematoxilină-eozină (HE), hematoxilină-eozină-alcian albastru (HEA) și PAS.

Analiza statistică. Rezultatele morfometriei mucoasei intestinale au fost prelucrate statistic prin intermediul testului ANOVA, pentru a evidenția semnificația diferențelor între toate loturile, urmată de testul Fisher și testul lui Student pentru a cuantifica diferențele semnificative între lotul martor și fiecare lot experimental. Diferențele au fost considerate semnificative când $p < 0,05$. Toate datele au fost analizate automat pe calculator cu ajutorul pachetului software Microsoft Office 2010 (Microsoft Inc., SUA).

II.5.2. Efectul suplimentării cu ZooBioR2 la nivelul mucoasei intestinale

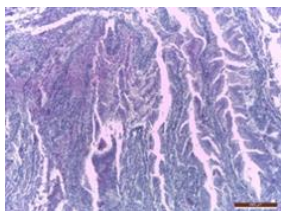


Figura 5.1. Duoden Lot Control. Vilozitățile sunt lungi cu aspect foliat și în axul vilozităților se observă un infiltrat limfoid difuz -Colorație HEAx40

Figure 5.1. Duodenum Lot Control. The villi are long with a foliated appearance and a diffuse lymphoid infiltrate is seen in the axis of the villi -HEAx40 staining

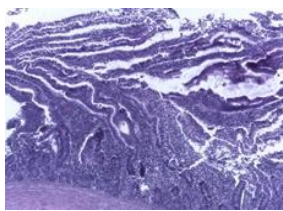


Figura 5.2. LE1 Duoden cu vilozitățile lungi, cu un diametru mai mare spre baza și redus spre polul luminal. Epiteliul columnar se desprinde în zona luminală a vârfului vilozității. Col HE x40

Figure 5.2. LE1 Duodenum with long villi, larger diameter towards the base and reduced towards the luminal pole. The columnar epithelium is detached in the luminal area of the tip of the villi. Col HE x40

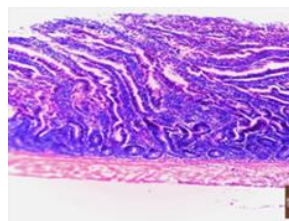


Figura 5.3. Duoden LE2. Vilozități lungi cu un diametru îngust și cu infiltrat limfoid redus în axul lor Colorație HE x40

Figure 5.3. Duodenum LE2. Long villi with a narrow diameter and reduced lymphoid infiltrates in their axis HE x40 staining

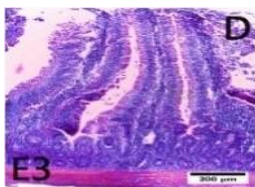


Figura 5.4. Duoden LE3

Vilozități lungi cu un diametru redus și cu infiltrate limfoide în axul lor. Colorație HEAx40

Figure 5.4. Duoden LE3 Long villi with a smaller diameter and lymphoid infiltrates in their axis. StainingHEAx40

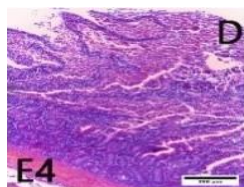


Figura 5.5. Duoden LE4 Col HEx100

Vilozități lungi cu un diametru mai redus și cu infiltrate limfoide în axul lor. Colorație HEA x40

Figure 5.5. Duoden LE4. Long villi with a smaller diameter and lymphoid infiltrates in their axis. StainingHEAx40

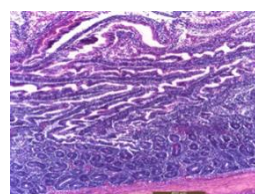


Figura 5.6. Jejune Lot Control. Vilozități lungi cu infiltrații limfoide difuze în axul vilozităților și periglandular Colorație HEA x40

Figure 5.6. Jejune Lot Control. Long villi with diffuse lymphoid infiltrates in the axis of the villi and periglandular staining HEA x40

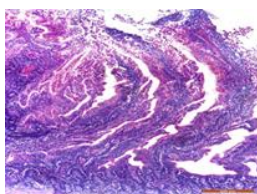


Figura 5.7. Mucoasa jejunului de la LE1 prezintă infiltrații limfoide în lamina propria a mucoasei în axul vilozităților.. Col HE x100.

Figure 5.7. The mucosa of the jejunum of LE3 shows lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa both in the axis of the villi and periglandular villous axis. The luminal pole villi have detached columnar epithelium. Col HE x100

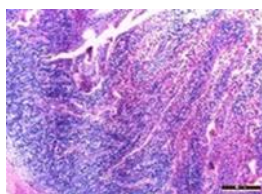


Figura 5.8 Mucoasa jejunului de la LE2 prezintă infiltrații limfoide în lamina propria a mucoasei atât în axul vilozității cât și periglandular. Vilozitățile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HE x100.

Figure 5.8. The jejunal mucosa of LE2 shows lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa both in the axis of the villi and periglandular villous axis. The luminal pole villi have detached columnar epithelium. Col HE x100

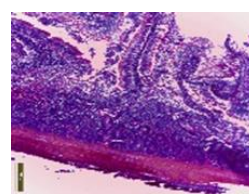


Figura 5.9. Mucoasa jejunului de la LE3 prezintă infiltrații limfoide în lamina propria a mucoasei atât în axul vilozității dar și aglomerări mari periglandular. Vilozitățile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HE x100.

Figure 5.9. The mucosa of the jejunum of LE3 shows lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa both in the axis of the villi and large periglandular clumps. Villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. Col HE x100.

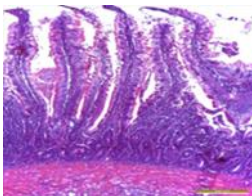


Figura 5.10. Jejun LE4- Colorație HEx100. Vilozități cu polul luminal care prezintă epiteliul desprins, infiltrații limfoide reduse în axul vilozităților și periglandular. Colorație HEx100

Figure 5.10 Jejunum LE4 – Villi with luminal pole showing detached epithelium, reduced lymphoid infiltration in the axis of the villi and periglandular HEx100 staining

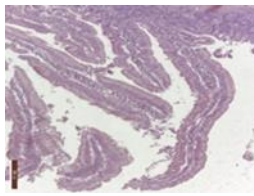


Figura 5.11. Mucoasa ileonului de la lotul control prezintă infiltrații limfoide reduse în lamina propria a mucoasei atât în axul vilozităților cât și periglandular. Vilozitățile la polul luminal au un diametru mic. Col HEx100

Figure 5.11. The ileum mucosa of the control group shows reduced lymphoid infiltration in the lamina propria of the mucosa in both the villous and periglandular axis. The villi at the luminal pole have a small diameter. HEx100 staining

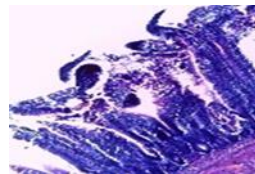


Figura 5.12. Mucoasa ileonului de la LE1 prezintă infiltrații limfoide reduse, dispuse difuz în lamina propria a mucoasei atât în axul vilozităților. Vilozitățile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col Hex100

Figure 5.12. The mucosa of the ileum of LE1 shows reduced lymphoid infiltrates, diffusely arranged in the lamina propria of the mucosa both in the axis of the villus. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. Col Hex100

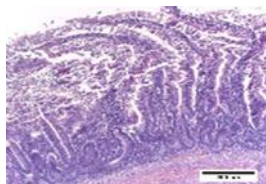


Figura 5.13. Mucoasa ileonului de la LE2 prezintă infiltrații limfoide mari în lamina propria a mucoasei și periglandular. Vilozitățile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col Hex100.

Figure 5.13. The mucosa of the ileum of LE2 shows large lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa and periglandular. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. Col Hex100

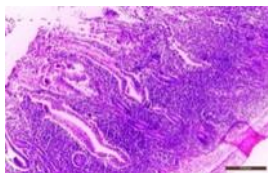


Figura 5.14. Mucoasa ileonului de la LE3 prezintă infiltrații limfoide mari în lamina propria a mucoasei periglandular. Vilozitățile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HE x100.

Figure 5.14. The ileum mucosa of LE3 shows large lymphoid infiltrates in the lamina propria of the periglandular mucosa. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. HEx100

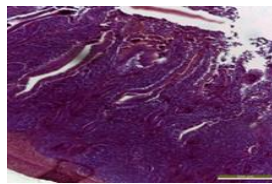


Figura 5.15. Ileon LE4 prezintă infiltrații limfoide mari în număr mai mare decât LE3 în lamina propria a mucoasei periglandular. Vilozitățile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HE x100.

Figure 5.15. The ileum mucosa of LE4 shows large lymphoid infiltrates in greater number than LE3 in the lamina propria of the periglandular mucosa. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. HEx100

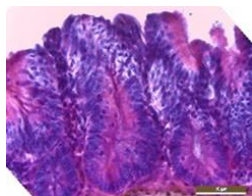


Figura 5.16. Cecum Lot C -Epiteliul de suprafață desprins iar cel glandular prezintă limfocite intraepiteliale. Colorație Hex400

Figure 5.16. Cecum Lot C- The surface epithelium is detached and the glandular epithelium shows intraepithelial lymphocytes Hex400 staining

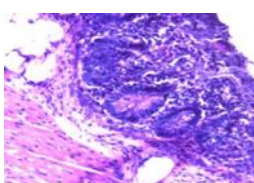


Fig. 5.17. Cecum provenit de la LE1. Se evidentiază integritatea epiteliului de suprafață și o infiltrație limfoidă difuză în lamina propria. Col HE x400

Figure. 5.17. Cecum came from LE1. There is evidence of surface epithelial integrity and diffuse lymphoid infiltration in the lamina propria. HE x400 staining

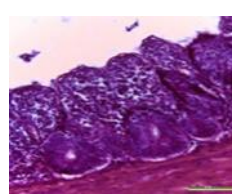


Figura 5.18. Cecum LE2. Epiteliul de suprafață este desprins. În lamina propria infiltrate limfoide difuze.- Colorație Hex 400

Figure 5.18. Cecum LE2. Surface epithelium is detached. In lamina propria diffuse lymphoid infiltrates. HE x 400 staining

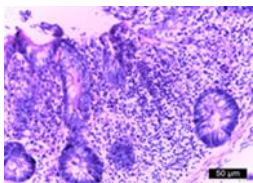


Figura 5.19 Cecum LE3. Epiteliul de suprafață este desprins În epiteliul glandular se observă numeroase limfocite intraepiteliale. Colorație HEx 400
Figure 5.19. Cecum LE3. The surface epithelium is detached In the glandular epithelium numerous intraepithelial lymphocytes are observed. HE x 400 staining

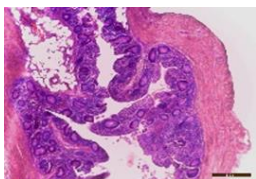


Figura 5.20. Cecum LE4-Colorație HEx 100. Epiteliul de suprafață este desprins. În lamina propria se observă un infiltrat limfoid redus periglandular. Colorație HEx 100
Figure 5.20. Cecum LE4. The surface epithelium is split In the lamina propria a reduced periglandular lymphoid infiltrate is observed. HEx 100 staining

Rezultate. Structura microscopică generală a fost tipică pentru fiecare secțiune analizată. O trăsătură specifică a duodenului a fost prezența vilozităților în formă de frunze și a criptelor drepte, longitudinale. În jejun, vilozitățile au un aspect digitiform, iar criptele sunt predominant longitudinale. Vilozitățile din cecum sunt scurte și de formă conică, în timp ce criptele sunt ramificate și mai superficiale în comparație cu celelalte segmente. Interiorul vilozităților și spațiile dintre cripte sunt ocupate de țesut conjunctiv, care conține numeroase vase sanguine și celule imunitare - limfocite și plasmocite. Nu au existat diferențe semnificative între diferitele secțiuni examinate din aceeași zonă intestinală pe parcursul experimentului.

Tunica submucoasă și tunica musculară aveau o structură tipică. Parametrii morfometrici care caracterizează arhitectura mucoasei au variat ușor între lotul martor și cele experimentale (cu adaos de ZooBior2). S-au constatat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește lungimea vilozităților și adâncimea criptelor în duoden, jejun, ileon și cecum între loturile experimentale și lotul martor.

Tabel 15 Valorile morfometrice ale mucoasei intestinale în timpul experimentului (μm)
Table 15 Morphometric values of intestinal mucosa during the experiment (μm)

Segmentul intestinal	Lotul	Grosimea musculară	Glandele Lieberkuhn	Înălțimea vilozităților	Diametrul vilozităților
Duoden	C	181,2±32	267,2±33	1266±188	338,6±49
	LE1	172,3±37	256,4±36	1161±194	165,4±32*
	LE2	154,7±24	247,8±28	1050±162	149,2±28**
	LE3	143,8±27*	225,2±30*	935,8±113*	142,6±25**
	LE4	134,6±24**	194,4±26*	898,6±97**	114,2±18**
Jejun	C	295,3±61	292,8±38	883,4±83	247,4±31
	LE1	281,6±54	254,4±31	758,2±82	170,2±20*
	LE2	270,4±63	183,6±24**	812,9±77	163,6±22**
	LE3	264,6±51*	241,8±32	789,4±89*	153,9±19**
	LE4	244,6±48**	212,4±27*	730,3±73**	143,1±17*
Ileon	C	258,6±57	200,7±32	716,8±62	171,3±21
	LE1	236,4±43	182,6±23	695,6±68	148,8±27
	LE2	220,3±38*	179,4±26	678,2±62	130,8±20
	LE3	224,6±43	163,8±28*	640,2±70*	122,6±17**
	LE4	204,2±34**	147,3±27*	564,6±62**	110,2±19**
Cecum	C	368,7±56	346,5±48	432,8±48	233,2±36
	LE1	255,7±47	297,6±52	345,6±41	219,7±29
	LE2	215,3±39	288,5±38	260,2±32	234,3±27
	LE3	184,4±27*	271,4±38*	198,4±28**	221,7±24
	LE4	107,5±19**	241,8±26**	154,4±18**	211,5±29

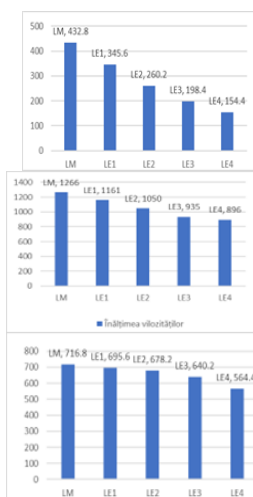


Figura 5.21. Înălțimea vilozităților duodenale
Figure 5.21. Duodenal villi height

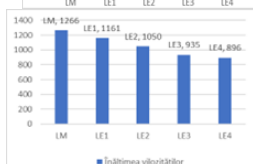


Figura 5.22. Înălțimea vilozităților cecale
Figure 5.22. Cecal villi height

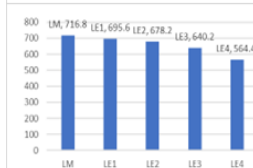


Figura 5.23. Înălțimea vilozităților ileale
Figure 5.23. Ileal villi height

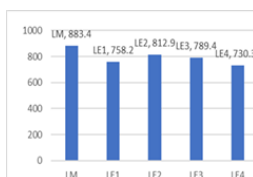


Figura 5.24. Înălțimea vilozităților jejunale
Figure 5.24. Jejunal villi height

Includerea în alimentație a ZooBior2 a determinat scăderea înălțimii medii a vilozităților în toate segmentele intestinale. Scăderea înălțimii vilozităților fiind cea mai semnificativă ($p = 0,011$) în cecum.



Figura 5.25. Grosimea musculară la nivelul duodenului
Figure 5.25. Muscle thickness of the duodenum



Figura 5.26. Grosimea musculară la nivelul jejunului
Figure 5.26. Muscle thickness at the jejunum



Figura 5.27. Grosimea musculară la nivelul ileonului
Figure 5.27. Muscle thickness at the ileum

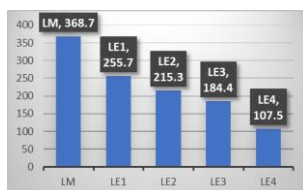


Figura 5.28. Grosimea musculară la nivelul cecului
Figure 5.28. Muscle thickness of the cecum

Grosimea tunicii musculare a fost semnificativ mai mică la loturile experimentale, în special LE3 și LE4, în comparație cu martorul, rezultatele fiind cele mai semnificative la duoden ($p=0,001$) și cecum ($p=0,004$). S-au observat puține enterocite cu semne de apoptoză la toate loturile experimentale.

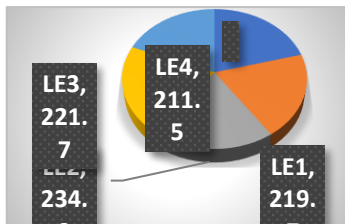


Figura 5.29. Diametrul vilozităților la nivelul cecumului

Figure 5.29. Cecum villi height

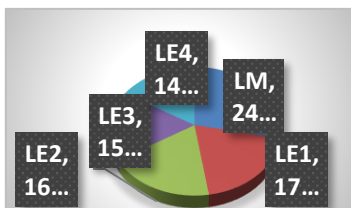


Figura 5.30. Diametrul vilozităților ileonului

Figure 5.30. Ileal villi diameter

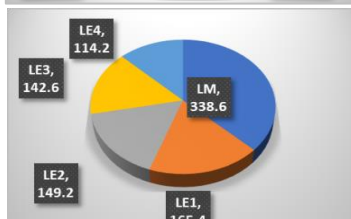


Figura 5.31. Diametrul vilozitaților duodenale

Figure 5.31. Duodenal villi diameter

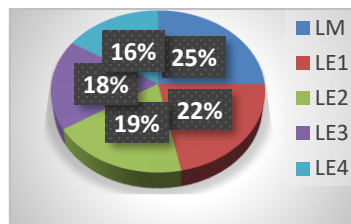


Figura 5.32. Diametrul vilozităților la nivelul jejunului

Figure 5.32. Jejunal villi height

Diametrul vilozităților a scăzut semnificativ la loturile experimentale (E2-E4) în duoden, jejun și cel mai semnificativ în ileon la lotul E4 ($p = 0,008$), și nesemnificativ în cecum.

În studiul nostru *S. platensis* nu a avut un efect semnificativ asupra lungimii vilozităților și adâncimii criptelor duodenale. Trebuie avut în vedere faptul că digestia are loc la păsări în partea superioară a intestinului subțire, respectiv în duoden, iar nutrienții eliberați sunt absorbiți în principal în partea inferioară a intestinului subțire. Este important de subliniat faptul că nu s-au observat diferențe notabile în ceea ce privește sănătatea generală între lotul martor și cele experimentale. Adaosul de *S. platensis* în rație nu a afectat sănătatea găinilor ouătoare.

Includerea în rație a extractului de *S. platensis* ZooBior2 a determinat o scădere a înălțimii vilozităților intestinale și a scăzut adâncimea criptelor în toate segmentele intestinale. O scădere a adâncimii criptelor este un indicator al unei rate mai mari de reînnoire a țesutului epitelial și ar putea fi implicată într-o mai bună digestibilitate a furajelor. Grosimea stratului muscular al duodenului și al cecumului a fost semnificativ mai mică la loturile experimentale comparativ cu lotul martor, fiind, de asemenea, implicată într-o digestibilitate mai bună a furajelor.

Discuții

Toyomizu și col. (2001) au raportat că au obținut rezultate destul de asemănătoare prin utilizarea *S. platensis* la puii de carne, în doze de 40 și 80 g/kg furaj. Ross și Dominy (1990), Mariey et al., (2012) au raportat, de asemenea, că la păsările hrănite cu adaos de Spirulina în dietă s-au obținut efecte benefice asupra performanțelor de productivitate.

Creșterea intensivă a păsărilor este însoțită de stres, care are un impact negativ asupra imunității și performanței productive. Rata metabolică ridicată în timpul hrănirii intensive este însoțită de o creștere a producției de radicali liberi și orice dezechilibru între sinteza și eliminarea acestora culminează cu stresul oxidativ, care poate afecta celulele și țesuturile (Lykkesfeldt et al, 2007, Miller et al, 1993). Prin urmare, în condiții de stres oxidativ, există o cerere crescută de antioxidanți pentru a reduce efectele nocive ale radicalilor liberi asupra sistemului imunitar. Este interesant faptul că hrănirea cu antioxidanți naturali, mai degrabă decât sintetici este benefică pentru bunăstarea animalelor și siguranța consumatorilor (Call et al, 2008, Carroll et al, 2007, Makkar et al, 2014).

Algele verzi-albastre *S. platensis* au fost considerate un produs antioxidant natural și imunostimulator adecvat pentru oameni și animale, cu mai puține efecte secundare și mai eficient din punct de vedere al costurilor decât produsele sintetice (Abdel et al, 2013, Belay et al, 2002, Khan et al, 2005).

S. platensis este o sursă alternativă adecvată de proteine în dietele pentru creșterea puilor putând înlocui soia în proporție de până la 50%. Cu toate acestea, nivelul de bază al aminoacizilor nu a fost suficient pentru a crea răspunsuri biologice interpretabile statistic.

A fost necesar un supliment cu aminoacizi pentru un spor îmbunătățit al creșterii atunci când soia a fost înlocuită în proporție de 50% cu Spirulina (Wecke et al, 2013).

Măsurătorile morfometrice ale lungimii vilozităților și ale adâncimii criptelor intestinale sunt utilizate pe scară largă, fiind considerate printre factorii care contribuie la menținerea homeostaziei intestinale (Franco et al, 2006). Lungimea vilozităților este un factor important care determină suprafața de absorbție a intestinului și, în consecință,

eficiența absorbției nutrienților (Caspary et al, 1992). În plus, raportul vilozități-cripte este corelat cu ciclul de exfoliere și regenerare a epiteliului intestinal.

Studiul a demonstrat că suplimentarea cu spirulină a dus la o creștere a înălțimii și lățimii vilozităților, a raportului adâncime criptă:înălțime vilozități și a numărului de celule caliciforme din intestinul subțire.

Aceste constatări sugerează un efect pozitiv al SPC asupra sănătății intestinului, a utilizării nutrienților și a creșterii (Khan et al, 2020). Aceste rezultate sunt în concordanță cu cercetările anterioare efectuate pe puii de carne, în care s-a raportat, de asemenea, că suplimentarea SPC influențează pozitiv înălțimea vilozităților, adâncimea criptei și numărul de celule caliciforme din intestin, îmbunătățind în cele din urmă absorbția nutrienților, indicele de conversie al hranei și câștigul în greutate (Shanmugapriya et al, 2014). Cea mai mare parte a absorbției de nutrienți are loc în jejun și ileon (Tasaki et al, 1966), care ar putea fi afectată atunci când ambele valori, și anume lungimea vilozităților și adâncimea criptelor, sunt reduse.

În plus, adâncimea mai mică a criptelor este un indicator al ratei de reînnoire a țesutului epitelial. S-a observat o relație între tipul de alimentație și grosimea tunicii musculare în intestinul păsărilor. Nivelul de de aminoacizi din dietele cu *S. platensis* a dus la o scădere semnificativă a grosimii tunicii musculare în duoden și jejun. Aceasta poate indica o motilitate mai scăzută a intestinului (Couraud et al, 2006). Motilitatea intestinală mai scăzută ar putea fi considerată un factor care oferă mai mult timp pentru procesele de digestie și absorbție.

Promotorii de creștere non-antibiotici includ acidifianti, probiotice, prebiotice, fitobiotice, enzime furajere, imunostimulatori și antioxidanți care au câștigat recent atenție. (Dragland et al, 2003, Pop et al, 2019).

Acestea au în structurile majorității plantelor mai multe componente bioactive importante, cum ar fi alcaloizi, amăreli, flavonoide, glicozide, mucilagii, saponine, taninuri fenoli, acizi fenolici, guinone, cumarine, terpenoizi, uleiuri esențiale, lectine și polipeptide . *Spirulina platensis* este o cianobacterie care este în general considerată o sursă bogată de proteine, acizi grași esențiali, vitamine și minerale.

Spirulina a fost utilizată în mod tradițional ca nutrient pentru oameni de sute de ani. Spirulina este, de asemenea, cunoscută ca fiind bogată în tiamină, riboflavină, piridoxină, vitamina B 12, vitamina C, acid gama linoleic, ficocianine, tocoferoli, clorofilă, β -caroten și carotenoizi (Abd 2003, Khan et al, 2005).

Până de curând, interesul pentru Spirulina a fost determinat în principal de valoarea sa nutritivă. Cu toate acestea, în ultimii ani s-a constatat că are multe proprietăți farmacologice. Numeroase studii preclinice și clinice sugerează mai multe efecte terapeutice, de la scăderea colesterolului și a tumorilor până la îmbunătățirea sistemului

imunitar, o creștere a lactobacililor intestinali, reducerea nefrotoxicității după expunerea la metale grele sau medicamente și protecție împotriva radiațiilor (Blinkova et al, 2001, Kuhad et al, 2006, Mohan et al, 2006).

Spirulina este, de asemenea, binecunoscută pentru proprietățile sale antioxidante, care sunt atribuite unor molecule precum ficocianina, beta-carotenul, tocoferolul (Lu et al, 2006, Upasani et al, 2003). S-a demonstrat că spirulina îmbunătățește funcția imunitară, reproducerea (Toyomizu et al, 2001, Yoshida et al, 1980).

Epiteliul intestinal acționează ca o barieră naturală împotriva bacteriilor patogene și a substanțelor toxice care sunt prezente în lumenul intestinal. Acești factori de stres provoacă tulburări ale microflorei normale și a epitelului intestinal, care pot altera permeabilitatea acestei bariere naturale, facilitând invazia agenților patogeni și a substanțelor nocive, alterând metabolismul, capacitatea de digestie și de absorbție a substanțelor nutritive și conducând la instalarea proceselor inflamatorii cronice ale mucoasei intestinale (Oliveira et al). Yoshida și Hoshii (1980) au administrat Spirulina în diferite cantități la puii în creștere, cu rezultate satisfăcătoare la niveluri cuprinse între 5 - 10% în furaj. Efectele prebiotice se bazează pe reducerea multor bacterii intestinale patogene sau nepatogene datorită scăderii pH-ului ca urmare a creșterii sintezei de acid lactic în cecum (Choi et al, 1994, Pelicano et al, 2004, Walker et al, 1998). Unele bacterii pot recunoaște situsurile de legare a moleculelor ca și cum ar fi pe mucoasa de la suprafață, iar colonizarea intestinală de către bacteriile patogene este astfel redusă. Prin urmare, există o incidență mai scăzută a proceselor infecțioase și a funcțiilor de secreție, digestie și absorbție a nutrienților care pot fi îndeplinite în mod corespunzător de mucoasă (Iji et al, 1998). Până în prezent, efectul microalgelor asupra morfologiei intestinale nu a fost studiat la păsările din țara noastră.

II.5.3. Expresia imunohistochimică a markerilor Nrf2, p65

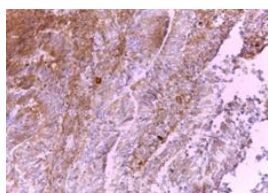


Figura 5.33. Se observă expresia lui p65 intracitoplasmatică intensă la lotul control a celulelor din lamina propria. Col IHC anti p65x100

Figure 5.33. The expression of intense intracytoplasmic p65 is observed in the control group of lamina propria cells. Col IHC anti p65x100

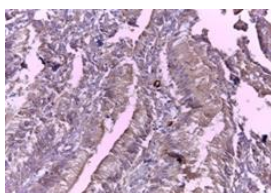


Figura 5.34. Se observă expresia lui p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden la lotul E1. Col IHC anti IL-6 x400

Figure 5.34. Moderate intracytoplasmic p65 expression of duodenal epithelial cells in batch E1 is observed. Col IHC anti p-65 x400

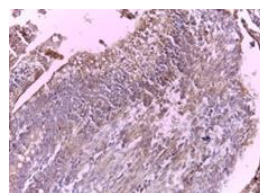


Figura 5.35. La lotul E2 se observă expresia p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti p65 x400

Figure 5.35. Moderate intracytoplasmic p65 expression in duodenal epithelial cells is observed in batch E2. Col IHC anti p65 x400

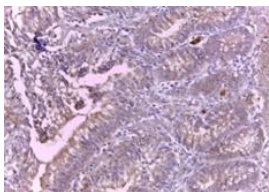


Figura 5.36. Se observă la LE3 expresia p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti p65 x400

Figure 5.36. Moderate intracytoplasmic p65 expression of duodenal epithelial cells is observed in LE3. Col IHC anti p65 x400

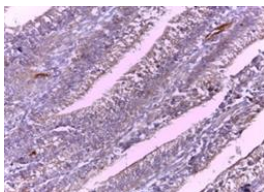


Figura 5.37. Se observă expresia p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti p65 x400

Figure 5.37. Moderate intracytoplasmic p65 expression is observed in duodenal epithelial cells. Col IHC anti p65 x400

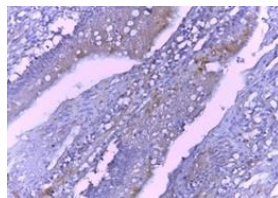


Figura 5.38. La lotul control Nrf2 se observă o expresia redusă a celulelor epiteliale și din lamina propria. Col anti Nrf2x400

Figure 5.38. Reduced expression of epithelial and lamina propria cells is observed in the Nrf2 control group. Col anti Nrf2x400

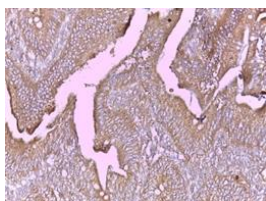


Figura 5.39. La LE2 se observă expresia Nrf2 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti Nrf2 x400

Figure 5.39. Moderate intracytoplasmic Nrf2 expression in duodenal epithelial cells is observed in LE2. Col IHC anti Nrf2 x400

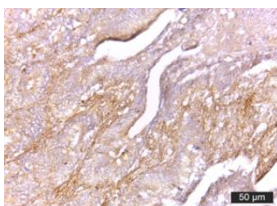


Figura 5.40. La LE4 Se observă expresia Nrf2 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti Nrf2x400

Figure 5.40. In LE4 Intracytoplasmic Nrf2 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti Nrf2 x400

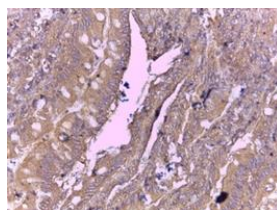


Figura 5.41. Se observă expresia Nrf2 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti Nrf2 x400

Figure 5.41. Moderate intracytoplasmic Nrf2 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti Nrf2 x400

Discuții

Spirulina are un impact benefic asupra florei gastro-intestinale, promovând un echilibru mai sănătos al microorganismelor și, de asemenea, îmbunătățește activitățile enzimelor digestive, ceea ce duce la o digestie generală îmbunătățită a materiei uscate și a azotului (Park et al, 2018). În plus, îmbunătățește digestibilitatea nutrienților, în special a aminoacizilor, precum și sinteza proteinelor (Evans et al, 2015), pe lângă faptul că îmbunătățește utilizarea energiei metabolizabile aparente (Tavernari et al, 2018). Mai mult, spirulina

influențează pozitiv compoziția populației microbiene intestinale prin reducerea prezenței bacteriilor dăunătoare, cum ar fi *E. coli*, și prin creșterea nivelului de bacterii lactice benefice (Abdelnour et al, 2020; Alwaleed et al, 2021). Prezența ficocianinei (PC) în spirulină stimulează producția de acizi grași cu lanț scurt și ajută la reducerea prezenței agenților patogeni dăunători în intestine, îmbunătățind astfel sănătatea intestinală (Xie et al, 2019).

Hu și colab. au sugerat o potențială modulare concertată a factorului nuclear legat de factorul nuclear-eritroid 2 (Nrf2)/elemente sensibile la antioxidanți (ARE) și a factorului nuclear-kappa B (NF-kB) în inflamație și carcinogeneză. Mulți antioxidanți fenolici și C-ficocianina își exercită efectele antiinflamatorii și antioxidante prin modularea integrată a căilor Nrf2 și NF-kB. În special, C-ficocianina a fost capabilă să inhibe NF-kB și să inducă Nrf2.

Spirulina induce diferențierea celulelor T native în diverse celule efectoare (Th1, Th2 și Th17) sau în celule T reg (Tr1 și Th3) și mențin toleranța față de antigene comensale și alimentare printr-o rețea complexă de răspunsuri celulare și moleculare.

Creșterea expresiei lui Nrf2 duce la scăderea expresiei lui p65. Adaosul de Spirulina platensis în dietă influențează pozitiv acest raport. Bineînțeles există și o legătură între dietă, TLAMD și microbiotă. Toate aceste elemente influențează expresia lui Nrf2 și p65.

Bacteriile intestinale joacă un rol critic în limitarea diseminării sistemice a bacteriilor comensale (Slack et al, 2012).

Un număr mare de evaluări nutriționale și toxicologice au raportat că biomasa de alge este un supliment valoros pentru hrana animalelor și poate fi considerată un substitut pentru sursele de proteine comune (făină de soia, făină de pește etc.).

Păsările de curte sunt principala țintă în cazul animalelor domestice, deoarece utilizarea algelor în dietele pentru păsări de curte reprezintă cea mai promițătoare oportunitate pentru utilizarea comercială a algelor în hrana animalelor. La păsările de curte, algele pot fi utilizate ca înlocuitor parțial al surselor de proteine comune, cu o încorporare de 5-10%. Spirulina o algă albastră-verde este bogată în: Vitaminele A, B1, B2, B3, B6, B12, D, E, K. Minerale: mangan, cupru, fier, zinc, seleniu, fosfor, calciu. Acizi grași esențiali: Omega 3 și Omega 6.

Proprietățile antiinflamatorii ale spirulinei pot fi atribuite capacității sale de a inhiba sinteza citokinelor proinflamatorii, cum ar fi TNF-gamma, IL-6 și IL-1, precum și activitățile enzimelor ciclooxygenază 2 (COX-2) și a sintezei oxidului

nitric inductibil (iNOS) (Hwang et al, 2011). În plus, SPC este prezentă în spirulină și prezintă un puternic efect antiinflamator (Romay et al, 1998).

Și aminoacizii esențiali abundenți care se găsesc în spirulină joacă un rol crucial în îmbunătățirea stării generale de sănătate și a capacității antioxidante mediate de Nrf2, atenuând în același timp tulburările de sănătate și atenuând efectele stresului termic.

Sistemul gastro-intestinal al puilor, care găzduiește o microbiotă diversă și complexă, poate beneficia de ajustări ad-hoc în compoziția furajelor pentru a include turmericul. Având în vedere eficacitatea spirulinei în scăderea numărului de coliformi și creșterea numărului de *Lactobacillus* în intestin (Samarasinghe et al, 2003), îmbunătățirea ecologiei microbiene intestinale prin aditivi fitogenici precum spirulina poate îmbunătăți starea imunitară a puiului de carne în timpul stresului. Cu toate acestea, datele referitoare la efectul de ameliorare a spirulinei asupra ecologiei microbiene intestinale a puilor de carne în timpul stresului sunt încă reduse. Este interesant de observat că, chiar și atunci când sunt utilizate în cantități mici, algele pot îmbunătăți sistemul imunitar, metabolismul lipidic, funcția intestinală și rezistența la stres (Norambuena et al. 2015).

Ținând cont că antibioticele care favorizau creșterea sunt interzise, cercetarea asupra țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale s-a dezvoltat pentru pre- și probioticele cele mai potrivite pentru stimularea sistemului imunitar intestinal. Efectele acestor aditivi furajeri se manifestă atât local cât și sistemic deoarece pot stimula și răspunsuri imune la nivelul altor organe prin sistemul imunitar comun al mucoasei. Funcționarea corectă a sistemului imunitar asociat mucoasei se bazează pe prezența bacteriilor intestinale benefice. Adaosul de spirulină influențează pozitiv populația bacteriană benefică de la nivel intestinal, îmbunătățește răspunsul imun umoral și celulare și dezvoltarea oganelor limfoide primare ale păsărilor. Mediul fizico-chimic al tractului gastro-intestinal depinde de mulți factori, dieta, metabolismii bacterieni și secreția corporală fiind factori determinanți majori. Există un echilibru delicat între mediul din lumen și funcționalitatea celulelor epiteliale, iar factorii alimentari sunt responsabili de expresia genelor din intestin și de adaptarea acestuia (Romay et al, 1998).

II.5.4. Expresia imunohistochimică a markerilor IL-6 și TNFAP18

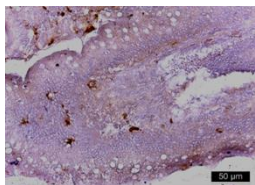


Figura 5.42. Expresia IL6 la lotul control. Se observă supraexpresia IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100

Figure 5.42. IL6 expression in control group. Intracytoplasmic IL6 overexpression of duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti IL-6 x100

Se observă supraexpresia IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100.

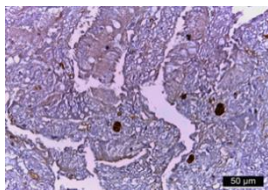


Figura 5.43. Expresia IL6 la LE1. Se observă expresia redusă a IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100

Figure 5.43. IL6 expression in LE1. Reduced intracytoplasmic IL6 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti IL-6 x100

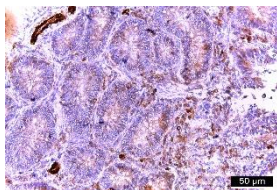


Figura 5.44. Expresia IL6 la lotul LE2. Se observă expresia IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100

Figure 5.44. IL6 expression in batch LE2. Intracytoplasmic IL6 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti IL-6 x100

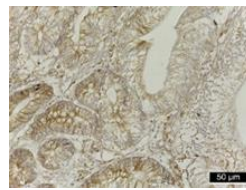


Figura 5.45. Se observa expresia IL6 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden la LE3. Col IHC anti IL-6 x100

Figure 5.45. Moderate intracytoplasmic IL6 expression is observed in duodenal epithelial cells of the LE3. Col IHC anti IL-6 x100

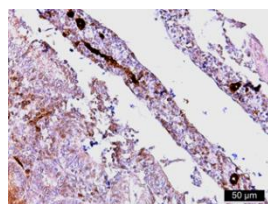


Figura 5.46. Expresia IL6 la lotul E4. Se observă expresia IL6 intracitoplasmatică moderată spre intensă la LE4. La baza epitelului se observă și prezența unui edem. Col IHC anti -IL6.

Figure 5.46. IL6 expression in batch E4. Moderate to intense intracytoplasmic IL6 expression is observed in LE4. At the base of the epithelium, edema is also present. Col IHC anti -IL6.

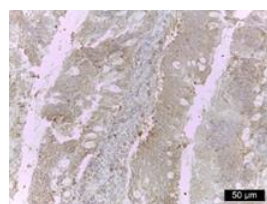


Figura 5.47. Expresia TNFAP18 la lotul control. Se observă expresia intensă, intracitoplasmatică moderat-intensă a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100

Figure 5.47. TNFAP18 expression in the control group. Intense, moderate-to-intense intracytoplasmic expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti TNFAP18 x100

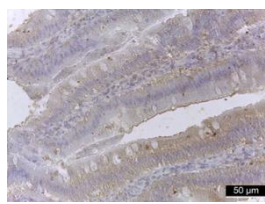


Figura 5.48. Expresia TNFAP18 la LE1. Se observă expresia intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100

Figure 5.48. Reduced intracytoplasmic expression of duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti TNFAP18 x100

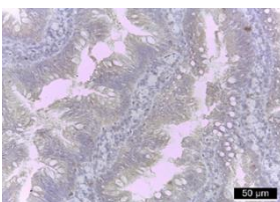


Figura 5.49. Expresia TNFAP18 la LE2. Se observa expresia intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100

Figure 5.49. TNFAP18 expression in LE2. moderate intracytoplasmic expression of duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti TNFAP18 x100

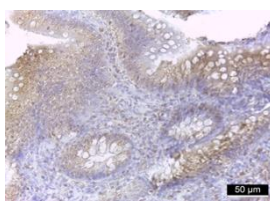


Figura 5.50. Expresia TNF alfa la lotul E3. Se observă expresia IL6 intracitoplasmatică moderată în celulele epiteliale și un edem la polul bazal al epitelului. Col IHC anti TNFAP18 x100

Figure 5.50. TNF alpha expression in the E3 group. Moderate intracytoplasmic IL6 expression is seen in epithelial cells and edema at the basal pole of the epithelium. Col IHC anti TNFAP18 x100

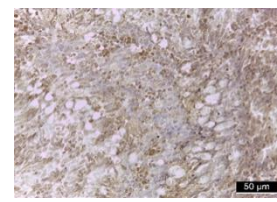


Figura 5.51. Expresia TNFAP18 la LE4. Se observă expresia intracitoplasmatică moderată spre intensă a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100

Figure 5.51. TNFAP18 expression in LE4. Moderate to intense intracytoplasmic expression is observed in duodenal epithelial cells. Col IHC anti TNFAP18 x100

II.5.5. Cercetări privind reactivitatea țesutului limfoid asociat mucoasei intestinului după expunerea găinilor ouătoare la ZooBior2

Țesutul limfoid asociat mucoasei intestinale

Evaluarea tesutului limfoid asociat mucoasei intestinale s-a realizat la nivelul plăcilor Payer din jejun și a amigdalelor cecale.

Plăcile Payer din jejun prezintă aglomerări limfoepiteliale mari, limfonoduli rari și epiteliul luminal desprins la loturile control, LE2, LE3, LE4. Plăcile Payer din jejun la LE1 prezintă aglomerări limfoepiteliale moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a pastrat integritatea morfologică.

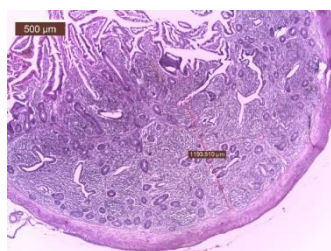


Fig 5.52 Plăcile Payer din jejun la păsările din lotul control prezintă aglomerări limfoepiteliale difuze, moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a pastrat parțial integritatea. Col HE x40.

Figure 5.52. Payer plaques in the jejunum of the control birds showed diffuse, moderate lymphoepithelial clumping, sparse lymph nodes and luminal epithelium that partially preserved its integrity. Col HE x40.

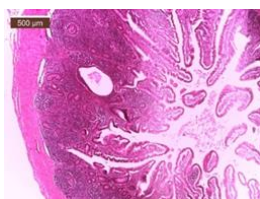


Fig 5.53. Plăcile Payer din jejun la LE1 prezintă aglomerări limfoepiteliale moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a păstrat integritatea. Col HE x40.

Fig 5.53. Payer's plaques in the jejunum of LE1 show moderate lymphoepithelial clusters, sparse lymph nodes and luminal epithelium that has preserved its integrity. Col HE x40.

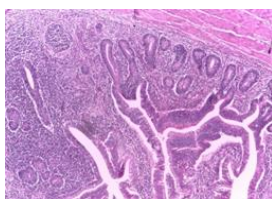


Figura 5.54. Plăcile Payer din jejun la LE2 prezintă aglomerări limfoepiteliale moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a pierdut parțial integritatea. Col HE x100

Figure. 5.54. Payer's plaques in the jejunum in LE2 show moderate lymphoepithelial clusters, sparse lymph nodes and luminal epithelium that has partially lost its integrity. Col HE x100

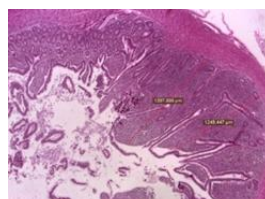


Fig. 5.55. Placa Payer de la păsările din LE3. Se observă aglomerări limfoepiteliale mari, limfonoduli rari și epiteliul luminal desprins. Col Hex40.

Figure 5.55. Payer plate from LE3 birds. Large lymphoepithelial clusters, sparse lymph nodes and detached luminal epithelium are observed. Hex40 col.

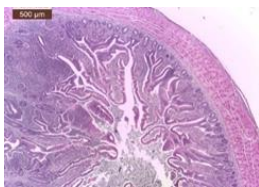


Figura 5.56. Placa Payer de la păsările din LE4. Se observă aglomerări limfoepiteliale mari, limfonoduli rari și edem la nivelul laminei propria din zona luminală. Col HE x40.

Figure 5.56. Payer plate from LE4 birds. Large lymphoepithelial clusters, rare lymph nodes and oedema of the lamina propria in the luminal area are observed. Col HE x40.

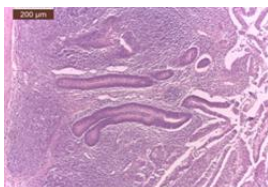


Figura 5.57. Amigdale cecale de la lotul control. Amigdalele cecale de la lotul control prezintă aglomerări limfoepiteliale, edem care determină desprinderea epiteliului de suprafață. Col HE x100.

Figure 5.57. Cecal tonsils from the control group. Cecal tonsils from control group show lymphoepithelial clumping, oedema causing detachment of surface epithelium. Col HE x100.

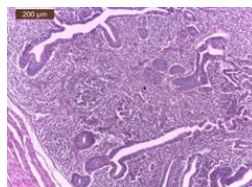


Figura 5.58. Amigdale cecale de la LE1. Amigdale cecale de la LE1 sunt formate din aglomerări limfoepiteliale în care se remarcă și limfonoduli. Col HE x100

Figure 5.58. Cecal tonsil of LE1. The cecal tonsils of LE1 consist of lymphoepithelial clusters in which lymph nodes are also noted. Col HE x100

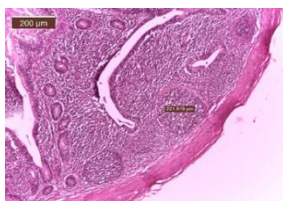


Figura 5.59. Amigdale cecale la LE2. La acest lot se evidențiază aglomerări limfoepiteliale și limfonoduli mici și rari. Col Hex100

Figure 5.59. Cecal tonsil at LE2. Small and rare lymphoepithelial clusters and lymph nodes are evident in this lot. HEx100 staining

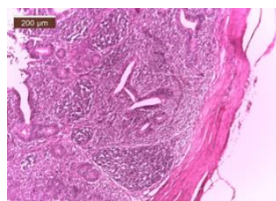


Figura 5.60. Amigdalelor cecale la păsările din LE3. În lamina propria a amigdalelor cecale la păsările din LE3 remarcăm țesut limfoid difuz asociat cu limfonoduli. Col HEx100

Figure 5.60. Cecal tonsils in LE3 birds. In the lamina propria of the cecal tonsils of LE3 birds we note diffuse lymphoid tissue associated with lymph nodes. HEx100 staining

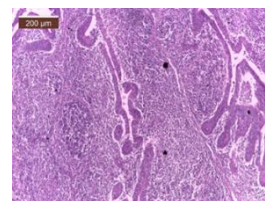


Figura 5.61. Amigdalele cecale la păsările din LE4. În lamina propria a amigdalelor cecale la păsările din LE3 remarcăm țesut limfoid difuz asociat cu limfonoduli. Col Hex100

Figure 5.61. Caecal tonsils from the LE4. Cecal tonsils in LE4 birds. In the lamina propria of the cecal tonsils in LE3 birds we note diffuse lymphoid tissue associated with lymph nodes. HE x100 stain

Discuții

O mare atenție a fost acordată activităților antioxidante și antiinflamatorii ale *Spirulinei* la multe specii de animale, care nu pot fi explicate doar prin conținutul de macro și micronutrienți al *Spirulinei*.

De asemenea, s-a demonstrat că extractul lipidic de *Spirulina* reprimă expresia și secreția citokinelor proinflamatorii ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ și $IL-6$) prin inhibarea căii NF-kB. În plus, *Spirulina* conține, de asemenea, heptadecan, o componentă volatilă care s-a dovedit a suprima expresiile genelor proinflamatorii prin reducerea activității NF-kB.

Cu toate acestea, trebuie luat în considerare faptul că polizaharidele conținute în *Spirulina* pot induce calea NF-kB. În plus, s-a observat, de asemenea, cum consumul de *Spirulină* a crescut activarea macrofagelor (activitatea fagocitară și producția de nitriți) la pui.

În plus, dincolo de beneficiile cunoscute ale PFA pentru performanță, rezultatele studiului au evidențiat potențialul PFA pentru protecția antioxidantă a gazdei, detoxifierea și gestionarea inflamației la nivel intestinal. În mod interesant, s-a demonstrat că, atunci când PFA a fost utilizat împreună cu dieta cu specificații scăzute, potențialul de cito-protecție la nivelul intestinului a fost maximizat (Finamore et al, 2017). De asemenea, *Spirulina* este bogată în Se, vitamina E, C etc.

Vitamina E este principalul antioxidant biologic care rupe lanțurile, localizat în membranele biologice ale diferitelor țesuturi.

Interesul pentru TLAMD aviar este în creștere în prezent. În țesutul limfoid asociat mucoasei intestinale, multe macrofage, celule dendritice, celule T și celule B care secretă IgA sunt mediatori importanți ai răspunsului imunitar dobândit (Campbell et al, 2002). Celulele reglatoare sunt prezente în organele imunitare intestinale pentru a menține toleranța la alimente și la autoantigene. La indivizii sănătoși, lipsa de reacție a celulelor T este menținută de către celulele dendritice rezidente

În ingredientele pentru alimente și furaje, vitamina E poate fi găsită sub formă de 4 tocoferoli și 4 tocotrienoli. Este posibil ca intestinul să fie un loc special pentru ca γ -tocopherolul și tocotrienolii să-și joace rolul antioxidant.

Recent, s-a demonstrat că reciclarea vitaminei E în celulă este cheia activității sale antioxidante. Acidul ascorbic, seleniul, vitaminele B1 și B2 sunt elemente importante ale reciclării vitaminei E. Prin urmare, dacă reciclarea este eficientă, chiar și o concentrație scăzută de vitamina E. Concentrații ridicate de vitamina E au fost prezente în mucoasa duodenului și a jejunului, cu o tendință spre niveluri mai scăzute în ileon și cecum și semnificativ mai puțin în colonul puilor. Diferitele izoforme ale vitaminei E au fost absorbite din digesta de către mucoasă fără o selectivitate majoră. În mod clar, vitamina E poate fi considerată ca fiind principalul contribuitor la potențialul antioxidant al digestiei. Trebuie menționat, de asemenea, că, dincolo de activitatea antioxidantă directă, vitamina E este implicată în modularea transcrierii și/sau activității enzimatică prin interacțiunea cu genele implicate în stresul oxidativ, proliferare, inflamație și apoptoză. De fapt, astfel de gene includ SOD, NO sintetaza, ciclooxygenază-2, NADPH oxidază, NF κ B (Surai Peter F. et al, 2015).

Deficitul de seleniu crește susceptibilitatea la boli infecțioase și sporește stresul biochimic ca răspuns la colonizarea agenților patogeni (Lee S.H. et al, 2014).

Se este necesar pentru funcționarea sistemului imunitar, iar deficitul de Se este asociat cu o pierdere a capacității imunitare. Se poate îmbunătăți capacitatea antioxidantă a

organismelor prin diferite căi. Se poate ameliora inflamația prin îmbunătățirea funcției antioxidante a tractului intestinal. Principala sursă de Se în organism provine din alimentație. Datele din literatura de specialitate referitoare la efectul Se asupra NF- κ B și inflamației pot fi împărțite în trei grupe. În primul rând, au fost prezentate efectele dăunătoare ale deficienței sau excesului de Se asupra semnalizării NF- κ B. S-a raportat că deficitul de Se atenuează imunitatea mucoasei duodenale de pui prin activarea căii de semnalizare NF- κ B.

În plus, a existat o corelație negativă puternică între nivelurile de expresie a proteinei NF- κ B și nivelurile de expresie a proteinei Nrf2 în duoden, jejun și ileon.

În comparație cu grupul de control, nivelurile de expresie a ARNm NF- κ B, IL-1 β și TNF- α au fost semnificativ mai ridicate în grupul OTA. Totuși, nivelurile de expresie a ARNm Nrf2 și HO-1 au fost semnificativ reduse. Cu toate acestea, creșterea nivelului de expresie a ARNm Nrf2 și HO-1 a fost semnificativă. Se a reprimat activarea macrofagelor prin suprimarea translocării nucleare a NF- κ B, care este implicată în transcrierea acestor citokine pro-inflamatorii, cum ar fi IL-6, TNF- α (Bi et al, 2016). Rezultatele acestui studiu indică o scădere semnificativă a nivelurilor ARNm NF- κ B, IL-1 β și TNF- α în grupul OTA + SeY, iar nivelurile de expresie a proteinei NF- κ B în intestinul puilor de carne au scăzut semnificativ, de asemenea, în comparație cu grupul OTA (Tong C et al, 2020).

Într-un alt studiu, ARNm al IL-1 β , IL-6 și IL-8 din pui atinge niveluri maxime în intestin între ziua 4 și 6 după infecții parazitare sau bacteriene pentru a iniția un răspuns de fază acută (Swaggerty și colab., 2004; Hong et al., 2006).

Spirulina este, de asemenea, bogată în polizaharide. Polizaharidele ar putea fi un imunopotențiator pentru a promova proliferarea limfocitelor B și a limfocitelor T, creșterea titrului de anticorpi serici și reducerea raportului dintre heterofilii și limfocitele din sânge. CD3+, CD4+ și CD8+ sunt markeri vitali ai limfocitelor T și pot fi utilizați ca indicatori ai răspunsului celulelor T.

Polizaharidele derivate din plante ar putea activa macrofagele prin recunoașterea și legarea la receptorii specifici de pe suprafețele macrofagelor, ceea ce este benefic pentru îmbunătățirea funcției imunitare și exercitarea unui efect imunomodulator. Liu et al. au descoperit că suplimentarea cu polizaharide *derivate din alge* a redus expresia ARNm relativă a TNF- α și IL-1 β în duodenul puilor de carne care au suferit de stres termic. În plus, modificarea structurală a contribuit la creșterea activității polizaharidelor (Zhang et al, 2021).

II.5.6. Efectele de îmbunătățire a productivității prin adaosul de ZooBior2

Obiectivele principale ale creșterii păsărilor sunt obținerea unei creșteri rapide, îmbunătățirea productivității și maximizarea eficienței furajelor.

Suplimentarea cu alge a demonstrat efecte benefice asupra performanței găinilor ouătoare. Un studiu realizat de (Hajati et al, 2019) a constatat că includerea de alge suplimentare în dietele pentru păsări a îmbunătățit consumul de hrană și creșterea producției. Acest lucru indică faptul că algele pot contribui la îmbunătățirea performanțelor păsărilor.

Prin adaosul de ZooBior2 s-a îmbunătățit starea generală a păsărilor prin reducerea fenomenelor inflamatorii la nivel intestinal, printr-un raport mai bun între înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor și prin creșterea imunității intestinale.

Toți acești factori influențează într-un final indicele de conversie al hranei și productivitatea.

În plus, cercetările (Park et al, 2018) sugerează că funcțiile fiziologice ale spirulinei și compoziția nutritivă pot avea efecte pozitive asupra sistemelor metabolice asociate și cu performanțele de creștere. Acest lucru indică faptul că spirulina, cu compoziția și proprietățile sale specifice, poate sprijini potențial producția dar și dezvoltarea păsărilor. Aceste constatări evidențiază potențialul încorporării algelor, cum ar fi spirulina, în dietele pentru păsări, ca mijloc de optimizare a performanțelor de creștere și de maximizare a productivității în industria avicolă. Studiile realizate de (Shanmugapriya et al, 2014, Kharde et al, 2012, Kaoud et al, 2015) oferă dovezi ale impactului pozitiv al suplimentării cu spirulină asupra performanțelor productive ale găinilor ouătoare, indicând că includerea ZooBior2 în dietele pentru păsări îmbunătățește conversia hranei (FC). S-a demonstrat că suplimentarea cu spirulină la diferite niveluri, cum ar fi 0,9 g/kg, promovează creșterea greutatei corporale la păsări, ceea ce poate fi atribuit absorbției mineralelor și vitaminelor prezente în SP.

Studiile evidențiază faptul că suplimentarea cu spirulină îmbunătățește eficiența utilizării hranei, ceea ce duce la o mai bună conversie a hranei. Această îmbunătățire a conversiei furajelor este asociată cu populația microbiană echilibrată din tractul gastrointestinal, care îmbunătățește absorbția vitaminelor și mineralelor din alimentație. Acest lucru, la rândul său, contribuie la performanța și sănătatea generală a păsărilor. În general, constatările sugerează că includerea SP în dietele pentru păsări poate avea efecte pozitive asupra conversiei furajelor și a productivității generale. Studiul realizat de (Shanmugapriya et al, 2014) a constatat că includerea de furaje care conțin 1% SP a dus la o scădere a grăsimii abdominale

la păsări în comparație cu grupul de control și cu alte grupuri suplimentate. Acest lucru sugerează că suplimentarea cu spirulină poate avea un impact pozitiv asupra reducerii depunerii grăsimii abdominale la păsări.

În plus, (Bellof et al, 2013) a raportat că suplimentarea dietei cu spirulină a îmbunătățit semnificativ parametrii carcasei de păsări în ceea ce privește factori precum randamentul și compoziția cărnii. Mai mult, (Toyomizu et al, 2001) a observat că hrănirea păsărilor cu spirulină la niveluri de 40 și 80 g/kg în dietele pentru găini ouătoare a dus la diferențe semnificative ($P < 0,01$) în ceea ce privește culoarea cărnii din mușchii păsărilor.

Este important de remarcat faptul că nu toate studiile care au investigat adaosul de spirulină sau de alte microalge în dietele pentru păsări au raportat efecte pozitive asupra performanțelor de creștere. Unele studii nu au constatat niciun efect semnificativ sau chiar efecte negative asupra parametrilor de creștere (Bonos et al, 2016, Altmann et al, 2018). El-Bahr și colab. (El-Bahr et al, 2020) au raportat că includerea a 1 g de SP/kg de dietă nu a influențat consumul de hrană (FI), raportul de conversie a hranei (FCR) sau greutatea corporală la pui. În mod similar, Altmann și colab. (Altmann et al, 2018) nu au constatat niciun efect notabil asupra greutateii vii sau a greutateii carcasei atunci când spirulina a înlocuit jumătate din proteinele din soia în dietele pentru pui. Aceste rezultate contrastante pot fi atribuite la diverși factori, inclusiv doza și durata suplimentării cu microalge, variațiile în condițiile experimentale, diferențele dintre tulpinile de păsări și variațiile în compoziția și calitatea microalgelor utilizate. În plus, prezența unor factori antinutriționali sau interacțiunile cu alte componente ale dietei pot contribui, de asemenea, la efectele observate. În general, efectele suplimentării cu microalge asupra performanței de creștere a păsărilor pot varia în funcție de condițiile specifice și de configurația experimentală. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege mai bine doza optimă, durata și interacțiunile potențiale ale suplimentării cu microalge în dietele pentru păsări pentru a obține rezultate de creștere consistente și pozitive. În acest sens, (Jamil et al, 2015) evidențiază un potențial efect negativ al suplimentării cu spirulină asupra performanței păsărilor. Adăugarea spirulinei în dietele pentru păsări a dus la o performanță cu 15% mai mică în comparație cu păsările care nu au fost suplimentate în timpul unei perioade specifice de două săptămâni (21-35 de zile). Cercetătorii au atribuit acest efect negativ vâscozității ridicate a digestiei, cauzată de gelifierea proteinelor nedigerabile prezente în spirulină.

Este interesant faptul că nici măcar adăugarea de enzime exogene, cum ar fi lizozimul sau Rovabio Excel AP, nu a îmbunătățit rezultatele negative. Deși lizozimul a fost capabil să descompună pereții celulari ai spirulinei, nu a împiedicat

gelifierea dăunătoare a proteinelor microalgei. Cercetătorii au sugerat că combinarea lizozimei cu o peptidază exogenă specializată ar putea potența digestia proteinelor din spirulină și ar putea preveni gelificarea. Acest studiu subliniază importanța luării în considerare a unor factori precum digestibilitatea și interacțiunile cu alte componente ale dietei atunci când se evaluează efectele suplimentării cu microalge în dietele pentru păsări. Gelifierea proteinelor și creșterea ulterioară a vâscozității digestiei pot avea un impact negativ asupra utilizării nutrienților și a performanțelor la păsări. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a explora strategiile potențiale de depășire a acestor provocări și pentru a optimiza utilizarea spirulinei sau a altor microalge ca aditivi furajeri în producția de găini ouătoare. Într-adevăr, constatările contradictorii dintre studii cu privire la efectele suplimentării spirulinei în dietele pentru păsări pot fi atribuite la diverși factori.

Iată câțiva factori posibili care pot contribui la aceste neconcordanțe.

1. *Nivelurile de spirulină:* Concentrația sau nivelul de includere a spirulinei în diete poate varia de la un studiu la altul. Diferitele niveluri de suplimentare pot avea efecte diferite asupra performanței puilor de carne.

2. *Hibrizi:* Diferite tulpini sau hibrizi de pui pot răspunde diferit la suplimentarea cu spirulină. Variațiile genetice dintre rasele de păsări pot influența capacitatea acestora de a utiliza nutrienții și de a răspunde la intervențiile dietetice.

3. *Vârsta:* Vârsta în momentul suplimentării cu spirulină poate influența rezultatele. Starea fiziologică și metabolică a puilor de carne se schimbă pe măsură ce cresc, ceea ce poate afecta răspunsul lor la intervențiile dietetice.

4. *Condițiile de cazare:* Variațiile în condițiile de adăpostire, cum ar fi temperatura, umiditatea și ventilația, pot avea un impact asupra performanțelor puilor de carne. Factorii de stres din mediul înconjurător pot interacționa cu suplimentarea cu spirulină și pot influența rezultatele.

5. *Pregătirea furajelor:* Prelucrarea și formularea dietelor pentru puii de carne, inclusiv metoda de încorporare a spirulinei, pot afecta disponibilitatea și digestibilitatea nutrienților. Diferențele în tehnicile de preparare a furajelor între studii pot contribui la variațiile rezultatelor.

6. *Metoda de administrare:* Modul în care spirulina este administrată la păsări poate varia. Ar putea fi amestecată direct în dietă, oferită ca supliment separat sau administrată prin intermediul apei de băut. Modul de administrare poate influența interacțiunea dintre spirulină și sistemul digestiv al păsărilor.

Având în vedere acești factori, este important să se interpreteze rezultatele studiilor individuale în contextul condițiilor experimentale specifice și al metodologiei utilizate. Cercetările ulterioare, cu protocoale standardizate și eșantioane de dimensiuni mai mari,

pot contribui la stabilirea unor concluzii mai consistente în ceea ce privește efectele suplimentării cu spirulina asupra performanței puilor de carne. Adaosul în dietă a Spirulinei reprezintă una din strategiile disponibile pentru a îmbunătăți indicele de conversie al hranei și productivitatea păsărilor. Scopul acestor strategii nutriționale a fost reducerea excreției totale de azot și a emisiilor de amoniac, probleme critice, în special în Uniunea Europeană, unde a fost introdusă o legislație strictă pentru a răspunde acestor preocupări (Greenhalgh și col., 2020). Cercetări recente efectuate în cadrul INCDBNA-Balotești (Proiect ADER 9.1.4) au evidențiat că reducerea cu 2 procente a nivelului de proteină brută în hrana păsărilor pe bază de surse proteice alternative locale (șroturi de rapiță și floarea-soarelui) permite obținerea unor performanțe productive și indici de calitate ai carcasei la nivelul potențialului genetic în cazul suplimentării cu aminoacizi esențiali la nivelul cerințelor hibridului. De asemenea nu afectează negativ dezvoltarea gastro-intestinală. Reduce tranzitul proteinei în intestinul subțire și poate reduce producția de metaboliți toxici proveniți din fermentația proteinelor în cecum. Trebuie amintit și faptul că are efecte pozitive asupra bunăstării păsărilor și asupra mediului prin reducerea azotului excretat în dejecții. Prin urmare, dezvoltarea și adoptarea unor soluții nutriționale cu nivel redus de proteină brută pot reduce dependența industriei avicole pentru surse de proteine „intacte” (de exemplu, șrot soia), pot crea oportunitatea utilizării surselor de proteine alternative, pot reduce costurile de producție și au impact pozitiv asupra mediului (Gheorghe et al, 2017).

II.5.7. Concluzii parțiale

1. Parametrii morfometrici ce caracterizează arhitectura mucoasei au variat ușor între lotul martor și cele experimentale la care s-a adăugat ZooBior2. S-au constatat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește lungimea vilozităților și adâncimea criptelor în duoden, jejun, ileon și cecum între loturile experimentale și lotul martor.
2. Înălțimea cea mai mare a vilozităților intestinale se observă la LE1 indiferent de segmentul studiat iar valorile cele mai mici ale înălțimii vilozităților au putut fi identificate la LE4, prin adaosul celei mai mari concentrații de ZooBior2.
3. Grosimea musculoasei are valorile cele mai mici la LE4 iar cele mai mari valori la LE1 iar grosimea stratului muscular al duodenului și al cecumului a fost semnificativ mai mică la loturile experimentale comparativ cu lotul martor, fiind, de asemenea, implicată într-o digestibilitate mai bună a furajelor.

4. Diametrul vilozităților la baza acestora cel mai mare se remarcă la LE1 iar cel mai mic diametru la LE4. Valorile sunt semnificativ mai mici la loturile experimentale decât la lotul martor. S-au observat puține enterocite cu semne de apoptoză la toate loturile experimentale.
5. În studiul nostru *S. platensis* nu a avut un efect semnificativ asupra lungimii vilozităților și adâncimii criptelor duodenale. Includerea în rație a extractului de *S. platensis*, ZooBior2 a determinat o scădere a înălțimii vilozităților intestinale și a scăzut adâncimea criptelor în toate segmentele intestinale. O scădere a adâncimii criptelor este un indicator al unei rate mai mari de reînnoire a țesutului epitelial și ar putea fi implicată într-o mai bună digestibilitate a furajelor.
6. La LE1 s-au constatat și limfonoduli mici. Epiteliul de la polul luminal este desprins la toate loturile experimentale.
7. Amigdalele cecale se caracterizează prin aglomerări limfoepiteliale mari acoperite de un epiteliu parțial desprins la toate loturile experimentale. Diferența dintre loturi o realizează prezenta limfonodulilor care sunt în număr variabil.
8. Expresia IL-6 este pozitivă la lotul control și LE4 și se reduce progresiv la LE2, LE3 și LE1.
9. Expresia TNFAIP8 și p65 au expresie asemănătoare IL-6. Prezența expresiei intense a acestor markeri semnalează un proces inflamator. Reducerea expresiei se realizează datorită suplimentării cu ZooBior2.
10. Nrf2 prezintă pozitivitate la LE1 care se reduce în ordinea loturilor LE2, LE3, LE4 și lotul control. Prezența expresiei Nrf2 la LE1 confirmă activarea acestui factor și implicarea acestuia în transcripția, translația enzimelor antioxidante.
11. Din punct de vedere economic cel mai avantajos este să se adauge o doză mai mică de ZooBior2 în dietă pentru creșterea productivității întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici dintre loturile experimentale.
12. Cu cât crește doza de ZooBior2 adăugat în hrană (de la 10 mg/kg furaj în sus) cu atât efectele benefice scad, valorile înălțimii vilozităților, a raportului înălțime vilozitate: adâncime criptă și productivitatea păsărilor se reduc semnificativ.

II.6. CONCLUZII FINALE

- 1) Prin adaosul de turmeric în dieta puilor, înălțimea vilozităților duodenale se observă la LE2 (1% turmeric) iar cea mai mică valoare la lotul control. Dintre loturile experimentale cea mai mică valoare a înălțimii vilozităților s-a observat la LE3

- 2) Valorile adâncimii criptelor cele mai mari le identificăm la LE3 (2% turmeric). Cele mai mici valori sunt la LE2 (1% turmeric). LE1 (0,5%) are o valoare apropiată de cele ale lotului martor.
- 3) Cel mai bun raport înălțime vilozitate: adâncime criptă se observă la LE2. Cel mai slab raport dintre toate loturile se observă la LE3.
- 4) Diametrul vilozităților cel mai mare la baza acestora se remarcă la LE3 iar cel mai mic diametru la LE1.
- 5) Din punct de vedere al expresiei IHC la nivel intestinal, s-a observat pozitivitate pentru IL-6 în grupurile de control și LE3, sugerând existența unui proces inflamator. Pulberea de turmeric a redus inflamația, astfel că la LE1 și LE2 expresia IL-6 a fost moderată spre negativ.
- 6) Expresia TNF alpha este mai intensă la loturile de control și la LE1, moderată la LE3. De asemenea colorația Pax-7 este pozitivă.
- 7) Adăugarea de doze mici și medii de turmeric duce la creșterea cea mai însemnată a expresiei Nrf2.
- 8) Adăugarea de 1% turmeric în dieta puilor broiler din LE2 a dus la creșterea cea mai intensă a expresiei Nrf2.
- 9) Adăugarea în dieta păsărilor de 1% turmeric duce la reducerea semnificativă a expresiei p65 și creșterea accentuată a expresiei Nrf2 în cecum.
- 10) Adăugarea de 1% și 2% turmeric în dieta puilor din LE2 respectiv LE3 a dus la scăderea accentuată a expresiei p65 la nivel cecal.
- 11) Există o legătură în cadrul proceselor de oxido-reducere între creșterea expresiei Nrf2 și scăderea expresiei p65 la nivel intestinal.
- 12) Plăcile Payer din jejun prezintă aglomerări limfoepiteliale cu rari limfonoduli la lotul control și LE1, LE3 cu epiteliul luminal desprins parțial. La LE2 s-a constatat prezența limfonodulilor în aglomerările limfoepiteliale și epiteliul integru la polul luminal.
- 13) Amigdalele cecale se caracterizează prin aglomerări limfoepiteliale mari la lotul control. La celelalte LE se observă și prezența limfonodulilor în aglomerările limfoide. Numărul lor este moderat la LE2 și LE1 și mai redus la LE3.
- 14) Legat de consumul de furaje, cea mai scăzută cantitate consumată s-a obținut prin adaosul de 0,5% turmeric în dieta puilor în prima perioadă de creștere cu valori de 110g în primele 7 zile, 390g între 7 și 14 zile și 900g până în ziua 21.
- 15) Între ziua 22 și 42 cea mai scăzută cantitate de hrană consumată s-a obținut la LE2 cu valori de 1400g până în ziua 29 iar până în ziua 42, 2000g.
- 16) Cel mai mic indice de conversie al hranei s-a observat la LE2 prin adaosul de turmeric în proporție de 1% în dieta puilor.

- 17) Greutatea puilor cea mai bună se observă la LE1 (0,5% turmeric) dar LE2 (1% turmeric) are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative. Valoarea greutateii puilor din LE1 în ziua 42 a fost de 2989.80 ± 32.30 g.
- 18) Din punct de vedere economic cel mai avantajos este să se adauge 1% turmeric în dietă pentru creșterea greutateii corporale întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici dintre loturile experimentale.
- 19) Ținând cont de particularitățile morfologice, reactivitatea țesutului limfoid, indicii de conversie al hranei scăzut, de consumul hranei în cea mai redusă cantitate și de greutatea puilor, concluzionăm că la sfârșitul perioadei de creștere adaosul de 1% turmeric în dietă a dus la cele mai bune rezultate chiar dacă în primele 14 zile de viață adaosul de 0,5% turmeric în hrană a dus la rezultate semnificativ mai bune.
- 20) Adaosul de 2% turmeric în hrană, la finalul perioadei experimentale, are efecte negative asupra indicatorilor mai sus menționați cu excepția adâncimii criptelor. Ceilalți indicatori au valori similare cu lotul martor, astfel încât nu se justifică din punct de vedere economic adaosul de 2% turmeric.
- 21) Parametrii morfometrici ce caracterizează arhitectura mucoasei au variat ușor între lotul martor și cele experimentale la care s-a adăugat ZooBior2. S-au constatat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește lungimea vilozităților și adâncimea criptelor în duoden, jejun, ileon și cecum între loturile experimentale și lotul martor.
- 22) Înălțimea cea mai mare a vilozităților intestinale se observă la LE1 indiferent de segmentul studiat iar valorile cele mai mici ale înălțimii vilozităților au putut fi identificate la LE4, prin adaosul celei mai mari concentrații de ZooBior2.
- 23) Grosimea musculoasei are valorile cele mai mici la LE4 iar cele mai mari valori la LE1 iar grosimea stratului muscular al duodenului și al cecumului a fost semnificativ mai mică la loturile experimentale comparativ cu lotul martor, fiind, de asemenea, implicată într-o digestibilitate mai bună a furajelor.
- 24) Diametrul vilozităților la baza acestora cel mai mare se remarcă la LE1 iar cel mai mic diametru la LE4. Valorile sunt semnificativ mai mici la loturile experimentale decât la lotul martor.
- 25) În studiul nostru *S. platensis* nu a avut un efect semnificativ asupra lungimii vilozităților și adâncimii criptelor duodenale. Includerea în rație a extractului de *S. platensis*, ZooBior2 a determinat o scădere a înălțimii vilozităților intestinale și a scăzut adâncimea criptelor în toate segmentele intestinale. O scădere a adâncimii criptelor este un indicator al unei rate mai mari de reînnoire a țesutului epitelial și ar putea fi implicată într-o mai bună digestibilitate a furajelor.

- 26) Țesutul limfoid din plăcile Peyer la nivelul jejunului este format din aglomerări limfoepiteliale mai reduse. La LE1 s-au constatat și limfonoduli mici. Epiteliul de la polul luminal este desprins la toate loturile experimentale.
- 27) Amigdalele cecale se caracterizează prin aglomerări limfoepiteliale mari acoperite de un epiteliu parțial desprins la toate loturile experimentale. Diferența dintre loturi o realizează prezența limfonodulilor care sunt în număr variabil la LE.
- 28) Expresia IL-6 este pozitivă la lotul control și LE4 și se reduce progresiv la LE2, LE3 și LE1.
- 29) Expresia TNFAIP8 și p65 au expresie asemănătoare IL-6. Prezența expresiei intense a acestor markeri semnalează un proces inflamator. Reducerea expresiei se realizează datorită suplimentării cu ZooBior2.
- 30) Nrf2 prezintă pozitivitate la LE1 care se reduce în ordinea loturilor LE2, LE3, LE4 și lotul control. Prezența expresiei Nrf2 la LE1 confirmă activarea acestui factor și implicarea acestuia în transcripția, translația enzimelor antioxidante.
- 31) Din punct de vedere economic cel mai avantajos este să se adauge o doză mai mică de ZooBior2 în dietă pentru creșterea productivității întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici dintre loturile experimentale.

Bibliografie

1. Abbas Zafar I. R. Z., Muhammad M. N. K., Zafar A., Zia M. A., 2010 - Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Braz. arch. biol. technol.* 53 (1), <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100008>;
2. Abbas, RJ., 2010 - Effect of using fenugreek, parsley and sweet basil seeds as feed additives on the performance of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*; 9:278-282;
3. Abd El-Baky H.H., 2003 - Blue green alga *Spirulina* sp. and its inhibitory effect on growth Ehrlich ascites carcinoma cells. *J. Med. Sci.*; 3: 314-324;
4. Abd El-Baky, HH; El Baz, FK; El-Baroty, GS., 2003 - *Spirulina* species as a source of carotenoids and α -tocopherol and its anticarcinoma factors. *Biotechnology.*, 2: 222-240. doi: 10.3923/biotech.2003.222.240;
5. Abd El-Hack, M.E.; Alagawany, M.; Chaudhry, M.T.; et al, 2020 - Does the gradual increase in dietary zinc oxide supplementation can affect egg quality, serum indices, and productive performance of laying hens? *Trop Anim Health Prod.*, 52, 525–531. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02038-2>;
6. Abdel-Daim MM, Abuzead SMM, Halawa SM, 2013 - Protective Role of *Spirulina platensis* against Acute Deltamethrin-Induced Toxicity in Rats. *PLoS ONE.*; 8(9): e72991, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072991>;
7. Abdel-Moneim Eid; Abdel-Moneim; Abdelrazeq M. Shehata; Noureldeen G. Mohamed; Ahmed M. Elbaz; Nashaat S. Ibrahim, 2022 - Synergistic effect of *Spirulina platensis* and selenium nanoparticles on growth performance, serum metabolites, immune responses, and antioxidant capacity of heat-stressed broiler chickens. *Biological Trace Element Research.*, volume 200, doi.org/10.1007/s12011-021-02662-w;
8. Abdelnour, SA; Abd El-Hack, ME; Alagawany, M; Farag, MR; Elnesr, SS, 2019 - Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *J Anim Physiol Anim Nutr.*, 103:477–84. doi/10.1111/jpn.13049;
9. Abdelnour, SA; Swelum, AA; Salama, A; Al-Ghadi, MQ; Qattan, SYA; Abd El-Hack, ME, 2020 - et al. The beneficial impacts of dietary phycocyanin supplementation on growing rabbits under high ambient temperature. *Ital J Anim Sci.*, 19:1046–56. doi: 10.1080/1828051X.2020.1815598;
10. Abdelrazeq M. Shehata; Vinod K. Paswan; Youssef A. Attia; Eid Abdel-Moneim; Mohammed Sh. Abougabal; Mohamed Sharaf; Reda Elmazoudy; Wejdan T. Alghafari; Mohamed A. Osman; Mayada R. Farag; Mahmoud Alagawany, 2021 - Managing Gut Microbiota through In Ovo Nutrition Influences Early-Life Programming in Broiler Chickens. *Animals (Basel).*, Dec; 11(12): 3491, doi: 10.3390/ani11123491;
11. Abudabos, AM; Alyemni, AH; Dafalla, YM; Khan, RU, 2017 - The effect of phytogenics on growth traits, blood biochemical and intestinal histology in broiler chickens exposed to *Clostridium perfringens* challenge. *J Appl Anim Res.*, 46:1, 691-695, doi: 10.1080/09712119.2017.1383258;
12. Adil, S; Magray, S, 2012 -. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: a review. *J Anim Vet Advances.*, 11:873–7. doi: 10.3923/javaa.2012.873.877 ;

13. Aebi, H, 1984 - Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105, 121–6. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3);
14. Ahmad, RS; Hussain, MB; Sultan, MT; Arshad, MS; Waheed, M; Shariati, MA; et al, 2020 - Biochemistry, Safety, Pharmacological Activities, and Clinical Applications of Turmeric: A Mechanistic Review. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 7656919. doi: 10.1155/2020/7656919;
15. Ahmad, Z; Xie, M.; Wu, Y.; Hou, S, 2019 - Effect of Supplemental Cyanocobalamin on the Growth Performance and Hematological Indicators of the White Pekin Ducks from Hatch to Day 21. *Animals.*, 9, 633. <https://doi.org/10.3390/ani9090633>;
16. Akosile, OA; Majekodunmi, BC; Sogunle, OM; Baloyi, JJ; Fushai, F; Bhebhe, E; et al, 2023 - Research Note: Responses of broiler chickens to in ovo feeding with clove and cinnamon extract under hot-humid environments. *Poult Sci.*, 102:102391. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102391>;
17. Aladaileh, SH; Khafaga, AF; Abd El-Hack, ME; Al-Gabri, NA; Abukhalil, MH; Alfwuaires, MA; et al, 2020 - *Spirulina platensis* ameliorates the sub chronic toxicities of lead in rabbits via anti-oxidative, anti- inflammatory, and immune stimulatory properties. *Sci Total Environ.*, 20;701:134879. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134879;
18. Alagawany, M; Elnesr, SS; Farag, MR, 2018 - The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. *Iran J Vet Res.*, 19:157–64;
19. Alito Shohe; V.K. Vidyarthi; R. Zuyie, 2019 - Performance of Broiler Chicken on Diet Supplemented with Turmeric Powder (*Curcuma longa*). *Livestock Research International.*, Pages 77-82;
20. Allain, CC; Poon, LS; Chan, CSG; Richmond, W; Fu, PC, 1974 - Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry.*, 20:470–5. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>;
21. Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Rawat M, Ma TY, 2016 - TNF- α modulation of intestinal tight junction permeability is mediated by NIK/IKK- α axis activation of the canonical NF- κ B pathway. *American Journal of Pathology* ; 186:1151-1165;
22. Al-Sultan SI, 2003 - The effect of *Curcuma longa* (turmeric) on overall performance of broiler chickens. *Int J Poult Sci.*, 2(5):351-353;
23. Al-Sultan SI, Gameel AA, 2004 - Histopathological changes in the livers of broiler chicken supplemented with turmeric (*Curcuma longa*). *International Journal of Poultry Science*; 3:333-336;
24. Altmann, B.A.; Neumann, C.; Velten, S.; Liebert, F.; Mörlein, D, 2018 - Meat Quality Derived from High Inclusion of a Micro-Alga or Insect Meal as an Alternative Protein Source in Poultry Diets: A Pilot Study. *Foods*, 7, 34. <https://doi.org/10.3390/foods7030034>;
25. Alwaleed, EA; El-Sheekh, M; Abdel-Daim, MM; Saber, H, 2021 - Effects of *Spirulina platensis* and *Amphora coffeaeformis* as dietary supplements on blood biochemical parameters, intestinal microbial population, and productive performance in broiler chickens. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 28(2):1801-1811. doi: 10.1007/s11356-020-10597-3;
26. Amer, S.A.; Al-Khalaifah, H.S.; Gouda, A.; Osman, A.; Goda, N.I.A.; Mohammed, H.A.; Darwish, M.I.M.; Hassan, A.M.; Mohamed, S.K.A, 2022 - Potential Effects of Anthocyanin-

- Rich Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract on the Growth, Intestinal Histomorphology, Blood Biochemical Parameters, and the Immune Status of Broiler Chickens. *Antioxidants*, 11, 544. <https://doi.org/10.3390/antiox11030544>;
27. Amer, SA; Beheiry, RR; Abdel Fattah, DM; Roushdy, EM; Hassan, FAM; Ismail, TA; et al, 2021 - Effects of different feeding regimens with protease supplementation on growth, amino acid digestibility, economic efficiency, blood biochemical parameters, and intestinal histology in broiler chickens. *BMC Vet Res.*, 17:283. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02946-2>;
28. Amer, SA; Naser, MAF; Abdel-Wareth, AAA; Saleh, AA; Elsayed, SAM; Abdel Fattah, DM; et al, 2020 - Effect of dietary supplementation of alpha-galactosidase on the growth performance, ileal digestibility, intestinal morphology, and biochemical parameters in broiler chickens. *BMC Vet Res.*, 16(1):144. doi: 10.1186/s12917-020-02359-7;
29. Amer, SA; Tolba, SA; AlSadek, DMM; Abdel Fattah, DM; Hassan, AM; Metwally, AE, 2021 - Effect of supplemental glycerol monolaurate and oregano essential oil blend on the growth performance, intestinal morphology, and amino acid digestibility of broiler chickens. *BMC Vet Res.*, 17, 312. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03022-5>;
30. Anantkawlas, M. A, 2014 - study of turmeric processing and its export from India. *Res Front.*, 2:51–6;
31. Anbarasan, V; Kumar, VK; Kumar, PS; Venkatachalam, T, 2011 - In vitro evaluation of antioxidant activity of blue green algae *Spirulina platensis*. *Int J Pharm Sci Res.*, 2:2616;
32. Angel, A; Justiz V.; Zohaib J.; Preeti P.; Kamleshun R., 2023 - Immunoglobulin, StatPearls Publishing;
33. Anjana S.; Smirnova E.; Karthikeyan A.; Moniruzzaman M.; Kalaiselvi S.; Nam K.; Le Goff G.; Min T., 2023 - The impact of curcumin on livestock and poultry animal's performance and management of insect pests. *Front. Vet. Sci.*, <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1048067>;
34. Araújo, C; Leon, L. Biological activities of *Curcuma longa* L, 2001 - *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 96(5):723-8. doi: 10.1590/s0074-02762001000500026;
35. Aronson, JK, 2017 - Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol.* Jan;83(1):8-19. doi: 10.1111/bcp.1293;
36. Arslan, M; Haq, A; Ashraf, M; Iqbal, J; Mund, MD, 2017 - Effect of turmeric (*Curcuma longa*) supplementation on growth performance, immune response, carcass characteristics and cholesterol profile in broilers. *Veterinaria.*, 66:16–20;
37. Attia Y, Bakhawain A, Bertu N., 2018 - Utilisation of thyme powder (*Thyme vulgaris* L.) as a growth promoter alternative to antibiotics for broiler chickens raised in a hot climate. *Europ.Poult.Sci.*, 82. DOI: 10.1399/eps.2018.238;
38. Attia, AY; Al-Harhi, AM; Hassan, SS, 2017 - Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) as a phytogenic growth promoter alternative for antibiotic and comparable to mannan oligosaccharides for broiler chicks. *Revista mexicana de ciencias pecuarias.*, 8:11. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4309>;
39. Attia, T; Elbanna, H; Zahran, M., 2020 - Effect of Dietary Supplementation of BAM-100® on Growth Performance, Haematological and Biochemical Parameters in Broiler Chickens. *J Curr Vet Res.*, 2, 2, 55-60. doi: 10.21608/jcivr.2020.121520;

40. Ayalew H.; Zhang H.; Wang J.; Wu S.; Qiu K.; Qi G.; Tekeste A.; Wassie T.; Chanie D., 2022 - Potential Feed Additives as Antibiotic Alternatives in Broiler Production. *Front Vet Sci.*; 9: 916473. doi: 10.3389/fvets.2022.916473;
41. Basiouni S.; Tellez-Isaias G.; Latorre J. D.; Graham B. D.; Petrone-Garcia V. M.; El-Seedi H. R.; Yalçın S.; El-Wahab A. A.; Visscher C.; May-Simera H. L.; Huber C.; Eisenreich W.; Shehata A. A., 2023 - Anti-Inflammatory and Antioxidative Phytogetic Substances against Secret Killers in Poultry: Current Status and Prospects. *Vet. Sci.*, 10(1), 55. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010055>;
42. Belay A., 2002 - The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *Review. J. Am. Nutraceut. Assoc.*;5: 27-48;
43. Bellof G, Alarcon SC., 2013 - Effect of *Spirulina platensis* in the organic broiler production. *Archiv für Geflügelkunde.*, 77:73–80;
44. Bermejo, P; Piñero, E; Villar, ÁM., 2008 - Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chem.*, 110:436–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.021>;
45. Bhat, VB; Madyastha, KM. C-Phycocyanin: A., 2000 - Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochemical and Biochem Biophys Res Commun.*, 18;275(1):20-5. doi: 10.1006/bbrc.2000.3270;
46. Bischoff Stephan, C; Giovanni B.; Wim B.; Theo O.; Jörg-Dieter S.; Matteo S.; Herbert T.; Alastair W.; Jerry M W., 2014 - Intestinal permeability-a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.*, 18;14:189. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7;
47. Blinkova LP, Gorobets OB, Baturo AP., 2001 - Biological activity of *Spirulina*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.*; 65(2):114-118;
48. Bolin Z.; Liu N.; Hao M.; Zhou J.; Xie Y.; He Z., 2021 - Plant-Derived Polysaccharides Regulated Immune Status, Gut Health and Microbiota of Broilers: A Review. *Front Vet Sci.*; 8: 791371. doi: 10.3389/fvets.2021.791371;
49. Bondar, A.; Macari, V.; Rudic, V.; Pistol, G.; Putin, V.; Rotaru, A.; Chiriac, T.; Solcan, G.; Solcan, C., 2022 - Effects of ZooBioR2 Product as Feed Supplement in Laying Hens on the Morphofunctional State of Intestinal Mucosa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 74 (4), 626–632. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12592>;
50. Bonos, E; Kasapidou, E; Kargopoulos, A; Karampampas, A; Nikolakakis, I; Christaki E, et al., 2016 - *Spirulina* as a functional ingredient in broiler chicken diets. *S Afr J Anim Sci.*, 46:94–102. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v46i1.12>;
51. Boroumand, N; Samarghandian, S; Hashemy, SI., 2018 - Immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant effects of curcumin. *J Herbmmed Pharmacol.*, 7: 211-219. doi: 10.15171/jhp.2018.33;
52. Brandtzaeg, P., 1984 - Immune functions of human nasal mucosa and tonsils in health and disease. In J. Bienenstock (Ed.). *Immunology of the Lung and Upper Respiratory Tract.*, pp. 2895. McGraw-Hill, New York;
53. Brestoff, JR; Artis, D., 2013 - Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol.*, 14(7):676-84. doi: 10.1038/ni.2640;

54. Brewer, MS., 2011 - Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci Food Safety.*, 10:221–47. doi/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x;
55. Brisbin, JT; Gong, J; Sharif, S., 2008 - Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Anim Health Res Rev.*, 9(1):101-10. doi: 10.1017/S146625230800145X;
56. Bronner F., 2003 - Mechanisms of intestinal calcium absorption. *Journal of Cellular Biochemistry.*, doi.org/10.1002/jcb.10330;
57. Brower, V., 1998 - Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nat Biotechnol.*, 16, 728–731. <https://doi.org/10.1038/nbt0898-728>;
58. Buckingham M, Relaix F., 2007 - The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 23:645-673;
59. Bunker J.J; Flynn T.M; Koval J.C., 2015 - Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity.*43:541–553;
60. Burns RM., 1983 - Antibody production suppressed in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) by zinc deficiency. *Avian Pathol.*, 12:141–146;
61. Butler JE; Sinkora M., 2013 - The enigma of the lower gut-associated lymphoid tissue (GALT). *J. Leukocyte. Biol.*, 94(2): 259-270;
62. C. M. Huang;T. T. Lee., 2018 - Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs — A review. *Asian-Australas J Anim Sci.*31(5): 617–627, doi: 10.5713/ajas.17.0657;
63. Call DR, Davis MA, Sawant AA., 2008 - Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim. Health Res. Rev.*; 9: 159-167. DOI:10.1017/S1466252308001515;
64. Camay, RM., 2023 - Visceral Characteristics of Broiler Chickens (*Gallus gallus domesticus*) Supplemented with Turmeric Rhizome Powder (*Curcuma longa*). *Universal J Agr Res.*, 11:300–5. DOI: 10.13189/ujar.2023.11020;
65. Campbell DJ., 2002 - Butcher EC. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med.*,195:135–141;
66. Cario, E., 2008 - Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunology* volume 1., pages S62–S66;
67. Carrasco Diaz J. M.; Casanova N., A.; Mariano, E; Miyakawa F., 2019 - Microbiota Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection?. *Microorganisms.*, 7(10) 374. DOI: 10.3390/microorganisms7100374;
68. Carroll JA, 2007- Forsberg NE. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*; 23: 105-149. DOI: 10.1016/j.cvfa.2007.01.003;
69. Caspary WF., 1992 - Physiology and Pathophysiology of Intestinal Absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*; 55 (1 Suppl): 299s-308s. DOI:10.1093/ajcn/55.1.299s;
70. Casteleyn C; Doom M; Lambrechts E; W Van den Broeck; P Simoens; P Cornillie., 2010 - Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review, *Avian Pathol.* 39(3):143-50. doi: 10.1080/03079451003786105;

71. Casteleyn, C; Doom, M; Lambrechts, E; Van den Broeck, W; Simoens, P; Cornillie, P., 2010 - Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. *AvianPathology.*, 39(3),143-150. doi: 10.1080/03079451003786105;
72. Cencic, A.; Chingwaru, W., 2010 - The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients*, 2, 611-625. <https://doi.org/10.3390/nu2060611>;
73. Cesta, M.F., 2006 - Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic Pathology.*, 34. DOI 599608;
74. Chaithanya C.; Jaewang G.; Sung H. R., 2018 - Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine* volume 50., pages1–9. DOI 10.1038/s12276-018-0126-x;
75. Chandran, DrD., 2021 - Veterinary Phytomedicine in India: A Review. *Int J Sci Res Sci Tech.*, 8:3, 598-605. doi : <https://doi.org/10.32628/IJSRST2183135>;
76. Charytonowicz E, Matushansky I, Castillo-Martin M, Hricik T, Cordon-Cardo C, Ziman M., 2011 - Alternate PAX3 and PAX7 C-terminal isoforms in myogenic differentiation and sarcomagenesis. *Clinical and Translational Oncology*; 13:194-203;
77. Chauhan SK, Singh BP, 1999 - Agrawala S. Estimation of curcuminoids in *Curcuma longa* by HPLC and spectrophotometric methods. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 61:58-60;
78. Chen J.; Tellez G.; Richards J. D.; Escobar J., 2015 - Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.*,. doi.org/10.3389/fvets.2015.00014;
79. Chen S.; Cheng A.; Wang M., 2013 - Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds. *Vet Res. Sep 9,v44(1):82*. doi: 10.1186/1297-9716-44-82;
80. Chengwei H. C.; Han G.; Shuzi X.; Rongxuan H.; Xueran G.; Yimin H.; Hongwei S.; Jingdong X., 2023 - View from the Biological Property: Insight into the Functional Diversity and Complexity of the Gut Mucus. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(4), 4227; <https://doi.org/10.3390/ijms24044227>;
81. Choct, M., 2009 - Managing gut health through nutrition. *Br Poult Sci.*, 50(1):9-15. doi: 10.1080/00071660802538632;
82. Choi KH, Namkung H, Paik IK., 1994 - Effects of dietary fructooligosaccharides on suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chickens. *Kor. J. Anim. Sci.*; 36:71-284;
83. Choi, JH;Kim, GB; Cha CJ., 2014 - Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens.*Poult Sci.*, 93:1942–50. Doi: 10.3382/ps.2014-03974;
84. Choudhury D, 2019 - Study on the nutrient composition of local variety of turmeric (*Curcuma longa*).*The Pharma Innovation Journal.*; 8(2): 205-207;
85. Chung H.; Sünje J; Pamp J., A; Neeraj H. , Surana Sanna K. M; Edelman Erin B; Troy Nicola, C. Reading Eduardo, Dennis L. K., 2012 - VOLUME 149, ISSUE 7., P1578-1593. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>;
86. Churchill, M; Chadburn, A; Bilinski, RT; Bertagnolli, MM., 2000 - Inhibition of intestinal tumors by curcumin is associated with changes in the intestinal immune cell profile. *J Surg Res.*, 89:169–175. doi: 10.1006/jsre.2000.5826;

87. Cleary, K; McFeeters, RF., 2006 - Effects of Oxygen and Turmeric on the Formation of Oxidative Aldehydes in Fresh-Pack Dill Pickles. *J Agric Food Chem.*, 54:3421–7. doi/10.1021/jf052868k;
88. Colin G. S.; Krystyna P.- K., 2014 - Biology of the gastro-intestinal tract in poultry. *Avian Biology Research* 7 (4)., 193–222. doi: 10.3184/175815514X14162292284822;
90. Couraud L, Jermyn K, Yam PS, Ramsey IK et al., 2006 - Intestinal Pseudo-Obstruction, Lymphocytic Leiomyositis and Atrophy of the Muscularis Externa in a Dog. *Vet. Record.*; 159: 86-87. doi: 10.1136/vr.159.3.86;
91. Cowan MM., 1999 - Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbial. Rev.*; 12: 564-582. DOI:10.1128/CMR.12.4.564;
92. Cui T.; Li P. ; Yu L.-H. ; Li L. ; Li K. ; Chen Y. ; Yang S.-H. ; Long M., 2020 - Selenium-rich yeast attenuates ochratoxin A-induced small intestinal injury in broiler chickens by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NF-KB activation. *Journal of Functional Foods.*, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103784>;
93. Daneshyar M, Ghandkanlo M, Bayeghra F, Farhangpajhoh F, Aghaei M., 2011 - Effects of dietary turmeric supplementation on plasma lipoproteins, meat quality and fatty acid composition in broilers. *SA J An Sci.*, 41:420–8. doi: 10.4314/sajas.v41i4.13
94. Das, L; Bhaumik, E; Raychaudhuri, U. et al., 2012 - Role of nutraceuticals in human health. *J Food Sci Technol.* 49, 173–183. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4>;
95. David B., 2014 - PhD, p65 and the NF-κB inflammatory pathway, <https://www.abcam.com/cancer/p65-and-the-nf-b-inflammatory-pathway>;
96. Deng P; Zhongtang Y. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes.*, Jan 1; 5(1): 108–119, doi: 10.4161/gmic.26945;
97. Deng, R; Chow, T-J., 2010 - Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina: Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. *Cardiovascular Therapeutics.*, 28:e33–45. doi/10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x;
98. Deplancke B.; H R. G., 2001 - Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 73, Issue 6, Pages 1131S-1141S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1131S>;
99. Dhama, K; Saminathan, M; Amarpal, JS; Tiwari, R; Sunkara, LT; Malik, YS; Singh, RK., V - Effect of Immunomodulation and Immunomodulatory Agents on Health with some Bioactive Principles, Modes of Action and Potent Biomedical Applications. *Int J Pharmacol.*, 11:253–90. doi: 10.3923/ijp.2015.253.290 ;
100. Dinarello, C., 1996 - Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.*, 87(6):2095-147. PMID: 8630372;
101. Dobrian, AD; Lieb, DC; Cole, BK; Taylor-Fishwick, DA; Chakrabarti, SK; Nadler, JL., 2011 - Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res.*, 50(1):115-31. doi: 10.1016/j.plipres.2010.10.005;
102. Dong-wei Z.; Fu M.; Gao S.-H.; Jun-Li L., 2013 - Curcumin and Diabetes: A Systematic Review. *Evid Based Complement Alternat Med.*, doi: 10.1155/2013/636053;

103. Dono, ND., 2014 - Turmeric (*Curcuma Longa* Linn.) Supplementation as an Alternative to Antibiotics in Poultry Diets. *Indones Bull Anim Vet Sci.*, 23:41–9. doi: 10.14334/wartazoa.v23i1.958;
104. Dorta, DJ; Pigoso, AA; Mingatto, FE; Rodrigues, T. și col., 2005 - The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chemicro-Biological Interactions* 152. 67–78;
105. Dragland SH, Senoo K, Wake K, Holte R. et al., 2003 - Several Culinary and Medicinal Herbs are Important Sources of Dietary Antioxidants. *J. Nutr.*;133 (5): 1286-1290. doi: 10.1093/jn/133.5.1286;
106. Duangnumsaeng Y.; Jürgen Z.; Farshad G. B., 2021 - Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry. *Front Immunol.* Oct 4;12:745849. doi: 10.3389/fimmu.2021.745849;
107. Duda-Chodak A; Tarko T; Satora P; Sroka P., 2015 - Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: A review. *Eur. J. Nutr.*, 54, 325–341;
109. Durrani, F; Ismail, M; Sultan, A; Suhail, S; Chand, N; Durrani, Z., 2006 - Effect of different levels of feed added turmeric (*Curcuma longa*) on the performance of broiler chicks. *Journal of Agricultural and Biological Science.*, 1:9–11;
110. Dyah W., Nurul H. , Retina Y. , Mijania M., 2017 - The Effect Of Turmeric As Immunostimulator Against Avian Influenza (AI)Vaccine, *Advances in Social Science, Education and Humanities Research (ASSEHR)*, , volume 98;
111. Eevuri, T; Putturu, R., 2013 - Use of certain herbal preparations in broiler feeds - A review. *Vet World.*, 6(3):172-9, doi: 10.5455/vetworld.2013.172-179;
112. Ekine O, Udoudo E, George O., 2020 - Influence of turmeric (*curcuma longa*) as feed additive on the performance, serum enzymes and lipid profile of broiler chickens. *Nigerian Journal of Animal Science.*, 22:57–63;
113. El-Bahr, S.; Shousha, S.; Shehab, A.; Khattab, W.; Ahmed-Farid, O.; Sabike, I.; El-Garhy, O.; Albokhadaim, I.; Albosadah, K., 2020 - Effect of Dietary Microalgae on Growth Performance, Profiles of Amino and Fatty Acids, Antioxidant Status, and Meat Quality of Broiler Chickens. *Animals*, 10, 761. <https://doi.org/10.3390/ani10050761>;
114. Elgeddawy, SA; Shaheen, HM, El-Sayed YS, Abd Elaziz M, Darwish A, Samak D, et al., 2020 - Effects of the dietary inclusion of a probiotic or prebiotic on florfenicol pharmacokinetic profile in broiler chicken. *J Anim Physiol Anim Nutr*,104:549–57. doi/10.1111/jpn.13317;
115. Elisabeth M. Liebler., 1986 - Mucosa-associated lymphoid nodules in the large intestine of young calves: A morphological study with special regard to lymphoepithelial., 1566826;
116. Elling-Staatsa M.L; M.S. Gilberta; H. Smidtb; R.P. Kwakkel., 2022 -Caecal protein fermentation in broilers: a review. *World,s poultry science*,Vol 78, pg 103-123. <https://doi.org/10.1080/00439339.2022.2003170>;
117. Elnesr, SS; Alagawany, M; Elwan, HAM; Fathi, MA; Farag, MR., 2020 - Effect of Sodium Butyrate on Intestinal Health of Poultry – A Review. *Ann Anim Sci.*, 20:29–41. doi: 10.2478/aoas-2019-0077 ;
118. Elnesr, SS; Ropy, A; Abdel-Razik, AH., 2019 - Effect of dietary sodium butyrate supplementation on growth, blood biochemistry, haematology and histomorphometry of

- intestine and immune organs of Japanese quail. *Animal.*, 13(6):1234-1244. doi: 10.1017/S1751731118002732;
119. Emadi M, Kermanshahi H, Maroufyan E., 2006 - Effect of varying levels of turmeric rhizome powder on some blood parameters of broiler chickens fed corn-soybean meal based diets. *International Journal of Poultry Science*; 6:345-348;
 120. Emadi, M; Kermanshah, H; Maroufyan, E., 2007 - Effect of Varying Levels of Turmeric Rhizome Powder on Some Blood Parameters of Broiler Chickens Fed Corn-Soybean Meal Based Diets. *Int. J Poult. Sci.*, 6:345–8. doi: 10.3923/ijps.2007.345.348 ;
 121. Emadi, M; Kermanshahi, H., 2006 - Effect of Turmeric Rhizome Powder on Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science.*, 5: 1069-72. doi: 10.3923/ijps.2006.1069.1072;
 122. Evans, AM; Smith, DL; Moritz, JS., 2015 - Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance. *J Appl. Poult Res.*, 24:206–14. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv027>;
 123. Everett, M.L., D. Palestrant S.E., Miller R.R., Bollinger, W.Parker, 2004 - Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial interactions in the gut *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 4.. pp. 321-332;
 124. Fallah R, Mirzaei E., 2016 - Effect of dietary inclusion of turmeric and thyme powders on performance, blood parameters and immune system of broiler chickens. *J. Livestock Sci.*, 7: 180-186;
 125. Farag, MR; Alagawany, M; Abd El-Hac, ME; Dhama, K., 2015 - Nutritional and Healthical Aspects of Spirulina (*Arthrospira*) for Poultry, Animals and Human. *Int J Pharm.*, 12:36–51. doi: 10.3923/ijp.2016.36.51;
 126. Fathi M.A; Namra M; M. S. Ragab and Aly, M., 2018 - Effect Of Dietary Supplementation Of Algae Meal (*Spirulina Platensis*) As Growth Promoter On Performance Of Broiler Chickens. *Egypt.Poult.Sci.*, Vol (38).. (375-389);
 127. Fathi, MA., 2018 - Effect of dietary supplementation of algae meal (*Spirulina platensis*) as growth promoter on performance of broiler chickens. *Egypt Poult Sci.*, 38:375–89;
 128. Favour O., Ugochi O., Okonkwo C., 2020 - Controlling coccidiosis in broilers using Tumeric paste, *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*; 5(4): 156-159;
 129. Ferket PR, Parks CW, Grimes JL., 2002 - Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. *Multi-State Poultry Meeting*, May 14-1;
 130. Ferreira-Hermosillo, A; Torres-Durán, P; Shamosh-Halabe, S; Juarez-Oropeza, M., 2011 - Biological effects of Spirulina and current research on its antioxidant activity. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica. Toctli RICTB.*, 2:1–13;
 131. Field, CJ; Johnson, IR; Schley PD., 2002 - Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukocyte Biol.*, 71:6–32. 10.1189/jlb.71.1.16;
 132. Finamore A.; Palmery M. Sarra B.; Ilaria P., 2017 - Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly Spirulina. *Oxid Med Cell Longev.* , 3247528. doi: 10.1155/2017/3247528;
 133. Flanagan DJ, Austin CR, Vincan E, Phesse TJ., 2018 - Wnt signalling in gastrointestinal epithelial stem cells. *Genes (Basel)*; 9:178;

134. Franco JRG, Murakami AE, Natali MRM, Garcia ERM. et al., 2006 - Influence of Delayed Placement and Dietary Lysine Levels on Small Intestine Morphometrics and Performance of Broilers. *Bras. J. Poult. Sci.*; 8 (4): 233-241. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2006000400006>;
135. Furbeyre H, van Milgen J, Mener T, Gloaguen M. et al., 2017 - Effects of Dietary Supplementation with Freshwater Microalgae on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Gut Health in Weaned Piglets. *Animal.*; 11 (2): 183-192. DOI:10.1017/S1751731116001543;
136. Galli LM, Knight SR, Barnes TL, Doak AK, Kadzik RS, Burrus LW., 2008 - Identification and characterization of subpopulations of Pax3 and Pax7 expressing cells in developing chick somites and limb buds. *Developmental Dynamics*; 237:1862-1874;
137. Gamage N. W., 2015 - Microbial Influence On Intestinal Development And Mode Of Action Of Mannan Oligosaccharides In Broiler Chicken;
138. Gandhi P, Khan Z, Chakraverty N., 2011 - Soluble curcumin: a promising oral supplement for health management. *J Appl Pharm Sci.*, 1:2, 01-7;
139. Gaona G., 2023 - Heat stress in poultry ,what oxidative stress has to do with it, why it affects gut health, and how phytomolecules support mitigation strategies. The Poultry Site. <https://www.thepoultrysite.com/articles/heat-stress-in-poultry>;
140. Gautam R, Jachak SM., 2009 - Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*; 29:767-820;
141. Gerald T. K., 2003 - The History of Nutrition: Malnutrition, Infection and Immunity. *J. Nutr.*, 133: 336S-340S. doi.org/10.1093/jn/133.1.336S;
142. Gheorghe A.; Hăbeanu M., 2017 - Furaje combinate complete și complementare (FCC) pentru puiul de carne. *Revista Lumea Satului.*, pg. 40;
143. Ghoreyshi, S.M.; Omri, B.; Chalghoumi, R.; Bouyeh, M.; Seidavi, A.; Dadashbeiki, M.; Lucarini, M.; Durazzo, A.; van den Hoven, R.; Santini, A., 2019 - Effects of Dietary Supplementation of L-Carnitine and Excess Lysine-Methionine on Growth Performance, Carcass Characteristics, and Immunity Markers of Broiler Chicken. *Animals.*, 9, 362. <https://doi.org/10.3390/ani9060362>;
144. Gilbert E.R; Li H; Emmerson D.A; Webb K.E. Jr; Wong E.A., 2010 - Dietary protein composition influences abundance of peptide and amino acid transporter messenger ribonucleic acid in the small intestine of 2 lines of broiler chicks. *Poultry Science*, , Pages 1663-1676. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00801>;
145. Gómez M Del Moral; Fonfria J; Varas A; Jiménez E; Moreno J; A G Zapata A.G., 1998 - Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (*Gallus gallus*) caecal tonsil. *Anat Rec.*, Feb;250(2):182-9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185;
146. Gong, J; Si W; Forster RJ; Huang R; Yu H; Yin Y și col., 2007 - 16s rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol*, 59:147-57. 10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x;
147. Gouda, MM; Prabhakar Bhandary, Y., 2018 - Natural antibiotic effect of turmeric in poultry management. *Int J Poul Fish Sci.*, 2(2):1-2. doi: 10.15226/2578-1898/2/2/00109;

148. Govindarajan, VS; Stahl, WH., 1980 - Turmeric — chemistry, technology, and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 12(3):199-301. doi: 10.1080/10408398009527278;
149. Gowda NK, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Bermudez AJ, Chen YC., 2009 - Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B1. *British Journal of Nutrition*; 102: 1629-1634;
150. Gowda, NKS; Ledoux, DR; Rottinghaus, GE; Bermudez, AJ; Chen, YC., 2008 - Efficacy of Turmeric (*Curcuma longa*), Containing a Known Level of Curcumin, and a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Ameliorate the Adverse Effects of Aflatoxin in Broiler Chicks. *Poult Sci.*, 87(6):1125-30. doi: 10.3382/ps.2007-00313;
151. Guil-Guerrero, J; Ramos, L; Zúñiga Paredes, J; Carlosama-Yépez, M; Moreno, C; Ruales, P., 2017 - Effects of turmeric rhizome powder and curcumin in poultry production. A review. *J Anim Feed Sci.*, 26(4):293-302. doi:10.22358/jafs/78511/201;
152. Gull N, Arshad F, Naikoo GA, Hassan IU, Pedram MZ, Ahmad A, et al., 2022 - Recent Advances in Anticancer Activity of Novel Plant Extracts and Compounds from *Curcuma longa* in Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointest Cancer*, 14:1–23. doi:10.1007/s12029-022-00809-z;
153. Günzel Dorothee; Alan S. L. Yu., 2013 - Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol Rev.*, 93(2): 525–569. doi: 10.1152/physrev.00019.2012;
154. Guzmán M. R.; Juan D. L. ; Ramiro D.; Xochitl H.-V.; Wolfenden A. D.; Teague K. D.; Graham L. E.; Mahaffey B. D.; Francis M.; Baxter A.; Hargis B. M.; Tellez G., 2017 - Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 7, Issue 2., Pages 116-120. doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.021;
155. Hachung C.; Sünje J; Pamp J.; A. Hill N.; K. Surana; Sanna, M; Edelman Erin B; Troy Nicola C; Reading Eduardo; Dennis L. Kasper., 2012 -Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *A cell press Journal*, VOLUME 149, ISSUE 7., P1578-1593 DOI:https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037;
156. Hafez MH, El-Kazaz SE, Alharthi B, Ghamry HI, Alshehri MA, Sayed S, Shukry M, El-Sayed YS., 2022 - The impact of curcumin on growth performance, growth-related gene expression, oxidative stress, and immunological biomarkers in broiler chickens at different stocking densities. *Animals (Basel)*; 12: 958;
157. Hafez, M.H.; El-Kazaz, S.E.; Alharthi, B.; Ghamry, H.I.; Alshehri, M.A.; Sayed, S.; Shukry, M.; El-Sayed, Y.S., 2022 - The Impact of Curcumin on Growth Performance, Growth-Related Gene Expression, Oxidative Stress, and Immunological Biomarkers in Broiler Chickens at Different Stocking Densities. *Animals*, 12, 958. https://doi.org/10.3390/ani12080958;
158. Hajati, H; Zaghari, M., 2019 - *Spirulina Platensis* in poultry nutrition. Cambridge Scholars Publishing., ISBN: 1-5275-2128-1;
159. Hamady, M; Walker, JJ; Harris, JK; Gold, NJ; Knight R., 2008 - Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods.*, 5:235–7. 10.1038/nmeth.1184;
160. Hang L, Sunday A. A., Layi A. and K. M. Ajuwon., 2014 - Anti-Inflammatory Effects of Non-Antibiotic Alternatives in *Coccidia* Challenged Broiler Chickens, *Journal of Poultry Science*; 51: 14-21;

161. Hazem H.; Amany F., 2018 - Histological Characterizations of the Gut Associated Lymphatic Tissue in Pigeon. *AJVS*, Vol. 59. 157-164. DOI: 10.5455/ajvs.16178;
162. Helal, NA; Eassa, HA; Amer, AM; Eltokhy, MA; Edafiogho, I; Nounou, MI., 2019 - Nutraceuticals' Novel Formulations: The Good, the Bad, the Unknown and Patents Involved. *Recent Pat Drug Deliv Formul.*;13(2):105-156. doi: 10.2174/1872211313666190503112040;
163. Hewlings, S.J.; Kalman, D.S., 2017 - Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*, 6, 92. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>
164. Hoffmann, J; Kroesen, A; Klump, B., 2009 - Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. ed. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme., doi:10.1055/b-002-21507;
165. Holt P. S; Vaughn L. E; Gast R. K., 2011 - Changes in Peyer's patch and cecal tonsil B lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Int. J. Poult. Sci.*, 10, 231–237;
166. Holt, PR; Katz, S; Kirshoff, R., 2005 - Curcumin Therapy in Inflammatory Bowel Disease: A Pilot Study. *Dig Dis Sci.*, 50(11):2191-3. doi: 10.1007/s10620-005-3032-8;
167. Horváth, M; Babinszky, L., 2019 - Impact of selected antioxidant vitamins (Vitamin A, E and C) and micro minerals (Zn, Se) on the antioxidant status and performance under high environmental temperature in poultry. A review. *Acta Agr Scand. Section A — Animal Science.*, 68:3, 152-160, doi:10.1080/09064702.2019.1611913;
168. Hoseini, SM; Khosravi-Darani, K; Mozafari, MR., 2013 - Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. *Mini Rev Med Chem.*, 13:1231–7. doi: 10.2174/1389557511313080009 ;
169. Hosseini Vashan, SJ; Golian, A; Yaghobfar, A; Zarban, A; Afzali, N; Esmaeilinasab, P., 2012 - Antioxidant status, immune system, blood metabolites and carcass characteristic of broiler chickens fed turmeric rhizome powder under heat stress. *Afr J Biotechnol.*, 11:16118–25. doi: 10.5897/AJB12.1986 ;
170. Hu R.; He Y.; Arowolo M. A.; Wu S.; He J., 2019 - Polyphenols as Potential Attenuators of Heat Stress in Poultry Production. *Antioxidants (Basel).*, Mar; 8(3): 67. doi: 10.3390/antiox8030067;
171. Huang C. M; Lee T.T., 2018 - Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs — A review. *Asian-Australas J Anim Sci.* ; 31(5): 617–627. doi: 10.5713/ajas.17.0657;
172. Huang M.T; Lysz T; Ferraro T; T F Abidi; J D Laskin; A H Conney., 1991- Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.*, 51(3):813-9.PMID: 1899046;
173. Huang, M-T; Ma, W; Lu, Y-P; Chang, RL; Fisher, C; Manchand, PS; et al., 1995 - Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12- O - tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis*, 16(10):2493-7. doi:10.1093/carcin/16.10.2493;
174. Huang, Z; Mei,X; Xu, D; Xu, S; Lv, J., 2005 - Protective effects of polysacchride of *Spirulina platensis* and *Sargassum thunbergii* on vascular of alloxan induced diabetic rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, 30:211–5. Chinese. PMID: 15719643;
175. Hussein, E.O.S.; Ahmed, S.H.; Abudabos, A.M.; Suliman, G.M.; Abd El-Hack, M.E.; Swelum, A.A.; N. Alowaimer, A., 2020 - Ameliorative Effects of Antibiotic-, Probiotic- and

- Phytobiotic-Supplemented Diets on the Performance, Intestinal Health, Carcass Traits, and Meat Quality of *Clostridium perfringens* -Infected Broilers. *Animals.*, 10, 669. <https://doi.org/10.3390/ani10040669>;
176. Huyghebaert, G; Ducatelle, R; Van Immerseel, F., 2011 - An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J.*, 187(2):182-8. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.03.003;
177. Hwang, J-H; Chen, J-C; Yang, S-Y; Wang, M-F; Liu, T-C; Chan, Y-C., 2011 - Expression of COX-2 and NMDA receptor genes at the cochlea and midbrain in salicylate-induced tinnitus: COX-2 and NMDA Receptor Gene Expression in a Tinnitus Model. *Laryngoscope.*, 121(2):361-4. doi: 10.1002/lary.21283;
178. Iji P., 1998 - Tivey DR. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. *Word's Poult. Sci. J.*; 54 (2):129-143. <https://doi.org/10.1079/WPS19980010>;
179. Ikpeama, A; Onwuka, G; Nwankwo, C., 2014 - Nutritional composition of Tumeric (*Curcuma longa*) and its antimicrobial properties. *IJSER.*, 5:1085-9;
180. Imoru, A; Onibi, G; Osho, I., 2018 - Nutritional and biochemical compositions of turmeric (*Curcuma longa* Linn) Rhizome powder-A promising animal feed additive. *IJSER.*, 9:424-9;
181. Jamil, A; Akanda, M; Rahman, M; Hossain, M; Islam, M., 2015 - Prebiotic competence of spirulina on the production performance of broiler chickens. *J Adv Vet Anim Res.*, 2:304;
182. Janabi Waheed, AH; Kamboh, AA; Saeed M, Xiaoyu, L; BiBi, J; Majeed, F; Naveed, M; Mughal, MJ; Korejo, NA; Kamboh, R; Alagawany, M; Lv, H., 2020 - Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci.* 23(2):140-153. doi: 10.22038/IJBMS.2019.35125.8353;
183. Jesse P. G., 2018 - Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-base and antioxidant status and diet considerations to improve mineral status, VOLUME 101, ISSUE 4., P2763-2813. doi.org/10.3168/jds.2017-13112;
184. Jeurissen S.H; Janse E.M; Koch G; De Boer, G.F., 1989 - Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell and Tissue Research.*, 258, 119124;
185. Jeurissen, SHM; Vervelde, L; Janse, EM., 1994 - Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poult Sci Rev.*, 5:183-207;
186. Jurenka, JS., 2009 - Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.*, 14:141-53. PMID: 19594223;
187. Kabir, S.M.L., 2009 - The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3531-3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>;
188. Kaetzel C.S. și col., 2005 - The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces, *Immunol. Rev.*, 206, pp. 83-99;
189. Kafi A; M.N. Uddin; M.J. Uddin; M.M.H. Khan; M.E. Haque., 2017 - Effect of Dietary Supplementation of Turmeric (*Curcuma longa*), Ginger (*Zingiber officinale*) and their Combination as Feed Additives on Feed Intake, Growth Performance and Economics of Broiler. *International Journal of Poultry Science.*, Page No.: 257-265. DOI: 10.3923/ijps.2017.257.265;

190. Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P., 2000 - Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology*; 146:3217-3226;
191. Kalra, E.K., 2003 - Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS Pharm Sci.*, 5, 25 <https://doi.org/10.1208/ps050325>;
193. Kaoud, HA., 2015 - Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. *Science Arena Publications, Specialty Journal of Biological Sciences.*, 1:2, 1-6;
194. Kasahara, Y; Chen, CL; Gobel, TWF; Bucy, RP; Cooper, MD., 1994 -Intraepithelial lymphocytes in birds. In: Kiyono H, McGhee JR, eds., *Mucosa Immunology: Intraepithelial Lymphocytes.*: Raven Press New York., p. 163–7;
195. Kaushik, P; Chauhan, A., 2008 - In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian J Microbiol.*, 48:348–52. doi: 10.1007/s12088-008-0043-0;
196. Kawalilak LT, Ulmer Franco AM, Fassenko GM., 2010 - Impaired intestinal villi growth in broiler chicks with unhealed navels. *Poultry Science*; 89:82-87;
197. Kelly J. R. ; Kennedy P.; Cryan J.; Dinan T.; Clarke G.; Hyland N., 2015 - Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci.* , 9: 392. doi: 10.3389/fncel.2015.00392;
198. Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS., 2005 - Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr. Pharm. Biotechnol.*; 6(5): 373-379. doi: 10.2174/138920105774370607;
199. Khan, RU; Naz, S; Javdani, M; Nikousefat, Z; Selvaggi, M; Tufarelli, V; et al., 2012 - The use of Turmeric (*Curcuma longa*) in poultry feed. *World's Poultry Science Journal.*, 68(1), 97-103. doi:10.1017/S0043933912000104;
200. Khan, S; Mobashar, M; Mahsood, FK; Javaid, S; Abdel-Wareth, AA; Ammanullah, H; et al., 2020 - *Spirulina* inclusion levels in a broiler ration: evaluation of growth performance, gut integrity, and immunity. *Trop Anim Health Prod.*, 52(6):3233-3240. doi: 10.1007/s11250-020-02349-9;
201. Khan, Z; Bhadouria, P; Bisen, P., 2005 - Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Biotechnol.*, 6(5):373-9. doi: 10.2174/138920105774370607;
202. Kharde, S; Shirbhate, R; Bahiram, K; Nipane, S., 2012 - Effect of *Spirulina* supplementation on growth performance of broilers. *Indian Journal of Veterinary Research.*, 21:66–9;
203. Khatun, A; Chowdhury, SD; Roy, BC; Dey, B; Haque, A; Chandran, B., 2019 - Comparative effects of inorganic and three forms of organic trace minerals on growth performance, carcass traits, immunity, and profitability of broilers. *J Adv Vet Anim Res.*, 6(1):66-73. doi: 10.5455/javar.2019.f313;
204. Kiczorowska B.; Samolińska W.; Ridha A.; Mustafa A.-Y.; Kiczorowski P.; Winiarska Mieczan A. 2017 - The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – a review. *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 17, No. 3., 605–625. DOI:10.1515/aoas-2016-0076;
205. Kochhar, K., 2008 - Dietary spices in health and diseases (II). *Indian J Physiol Pharmacol.*, 52:327–54;

206. Kogut, MH., 2019 - The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 250:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008>;
207. Kollarcikova M.; Kubasova T.; Karasova D.; Crhanova M.; Cejkova D.; Sisak F.; Rychlik I., 2019 - Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota. *Poult Sci.*, Jun 1;98(6):2347-2353. doi: 10.3382/ps/pey594;
208. Koren, O; Goodrich, JK; Cullender, TC; Spor, A și col, 2012 - Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell.*, 150:470–80.doi: 10.1016/j.cell.2012.07.008;
209. Kosti D, Dahiya DS, Dalal R, Us V, 2018 - Effect of supplementing different levels of turmeric powder on ileal morphology in laying hens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*; 7:1524-1532;
210. Kosti, D; Dahiya, DS; Dalal, R; Tewatia, BS; Vijayalakshmy, K, 2020 - Role of turmeric supplementation on production, physical and biochemical parameters in laying hens. *World's Poult Sci J.*, 76:3, 625-637, doi: 10.1080/00439339.2020.1764460 ;
211. Kotha RR, Luthria DL, 2019 - Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical Aspects. *Molecules*; 24:2930.
213. Kuhad, A; Tirkey, N; Pilkhwai, S; Chopra, K. , 2006 - Renoprotective Effect of *Spirulina fusiformis* on Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Renal Dysfunction in Rats. *Ren Fail.*, 28:247–54. doi: 10.1080/08860220600580399;
214. Kumar S, Chen C, Indugu N, Werlang GO, Singh M, Kim WK, și col., 2018 - Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens.*PloS ONE.*, 13:e0192450.Doi: 10.1371/journal.pone.0192450;
215. Kumar, M; Barbhai, MD; Hasan, M; Punia, S; Dhumal, S; Radha, Rais N; et al., 2022 - Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. *Biomed Pharmacother.*, 146:112498. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112498;
216. Kumar, S. and Pitta, D.W., 2015 - Revolution in Rumen Microbiology. In: Puniya, A., Sinh, R. and Kamra, D., Eds., *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, Springer, New Delhi., 357-379. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_24;
217. Kumari, P; Gupta, M; Ranjan, R; Singh, K; Yadava, R., 2007 - *Curcuma longa* as feed additive in broiler birds and its patho-physiological effects. *Indian J Exp Biol.*, 45(3):272-7. PMID: 17373373;
218. Kunwar A; Barik A; Pandey R; Priyadarsini K.I., 2006 - Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta (Gen.)*, 1760:1513–1520. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.06.012;
219. Kurkure, N; Pawar, S; Kognole, S; Bhandarkar, A; Ganorkar, A; Kalorey, D., 2000 - Ameliorative effect of turmeric (*Curcuma longa*) in induced aflatoxicosis in cockerels. *Ind J Vet Pathol.*, 24:26–8;
220. Laganá, C; Saldanha, ESPB; Sartori, JR; Turco, PHN; Gonzales, E; Luciano, RL; et al., 2019 - Turmeric on Poultry Production: A Review. *Agricultural Sciences.*, 10, 1592-1601. <https://doi.org/10.4236/as.2019.1012117>;

221. Laguna E. B., Bigtasin Ampode K. M., 2021 - Turmeric Powder: Potential Alternative to Antibiotics in Broiler Chicken Diets. *Journal of Animal Health and Production*, 9(3):243-253, DOI:10.17582/journal.jahp/2021/9.3.243.253;
222. Lan Y, Verstegen MWA, Tamminga S, Williams BA., 2005 - The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal.*, 61(1), 95-104. doi:10.1079/WPS200445;
223. Latek U.; Chłopecka M.; Wojciech K.; Mendel M., 2022 - Phytogetic Compounds for Enhancing Intestinal Barrier Function in Poultry—A Review. *Planta Med.*, 88(03/04): 218-236. DOI: 10.1055/a-1524-0358;
224. Lee S.H; Lillehoj H.S; S.I. Jang; M.S. Jeong; S.Z. Xu; J.B. Kim; H.J. Park; H.R. Kim; E.P. Lillehoj; D.M. Bravo., 2014 - Effects of in ovo injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry Science.*, Pages 1113-1121. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03770>;
225. Lee SH, Lillehoj HS, Hong YH, Jang SI, Lillehoj EP, Ionescu C, Mazuranok L, Bravo D., 2010 - In vitro effects of plant and mushroom extracts on immunological function of chicken lymphocytes and macrophages. *British Poultry Science*; 51:213-221;
226. Li Y; Q. G. Ma Q. G.; Zhao L. H, Y. Q. Guo. G. X. Duan; Zhang J.Y; C. Ji., 2014 - Protective Efficacy of Alpha-lipoic Acid against AflatoxinB1-induced Oxidative Damage in the Liver. *Asian-Australas J Anim Sci.* Jun; 27(6): 907–915. doi: 10.5713/ajas.2013.13588;
227. Li, Y; Wang, J; Liu, Y; Luo, X; Lei, W; Xie, L., 2020 - Antiviral and virucidal effects of curcumin on transmissible gastroenteritis virus in vitro. *J Gen Virol.*, 101(10):1079-1084. doi: 10.1099/jgv.0.001466;
228. Lin X.; Bai D.; Wei Z.; Zhang Y.; Huang Y.; Deng H.; Huang X., 2019 - Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2- Keap1 pathway, *PLOS ONE.*, | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216711>;
229. Liu WC; Zhu YR; Zhao ZH; Jiang P; Yin FQ., 2021 - Effects of dietary supplementation of algae-derived polysaccharides on morphology, tight junctions, antioxidant capacity and immune response of duodenum in broilers under heat stress. *Animals.* 11:2279. DOI 10.3390/ani11082279;
230. Lovkova, MY; Buzuk, GN; Sokolova, SM. et al., 2001 - Chemical Features of Medicinal Plants (Review). *Appl Bioch Microbiol.*, 37, 229–37. <https://doi.org/10.1023/A:1010254131166>;
231. Lu H, Adedokun SA, Adeola L, Ajuwon KM., 2014 - Anti-inflammatory effects of non-antibiotic alternatives in Coccidia challenged broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*; 51:14-21;
232. Lu HK, Hsieh CC, Hsu JJ, Yang YK. et al., 2006 - Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *Eur. J. Appl. Physiol.*; 98 (2): 220–226. doi: 10.1007/s00421-006-0263-0;
233. Lu, J; Idris, U; Harmon B; Hofacre, C; Maurer ,JJ; Lee MD., 2003 -Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol.*, 69:6816–24. 10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003;

234. Luca SV, Kulinowski L, Ciobanu C, Zengin G, Czerwinska ME, Granica S, Xiao J, Skalicka-Woźniak K, Trifan A., 2022 - Phytochemical and multi-biological characterization of two *Cynara scolymus* L. varieties: A glance into their potential large scale cultivation and valorization as bio-functional ingredients. *Industrial Crops and Products*; 178:114623;
235. Lykkesfeldt J, Svendsen O., 2007 - Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet.J.*; 173 (3): 502-511. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.06.005;
236. MAA Qasem; MS Alhajj; AR Jer El Nabi; SI Al-Mufarrej., 2016 - Effects of dietary supplement of turmeric powder (*Curcuma longa*) on blood biochemistry parameters and antioxidant activity in chickens. *South African Journal of Animal Science.*, 46 (No. 2). DOI: 10.4314/sajas.v46i2.12;
237. Madeira MS, Cardoso C, Lopes PA, Coelho D, Afonso C, Bandarra NM, et al., 2017 - Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science.*, 205:111–21. doi: 10.1016/j.livsci.2017.09.020;
238. Maiorka, A; AVF Silva; E Santin; LDG Bruno; Boleli IC.; Macari. M., 2016 - Effect of Broiler Breeder Age on the Intestinal Mucosa Development of the Embryos at 20 Days of Incubation. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 18 (spe 2).. doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0130;
239. Makkar HPS, Tran G, Heuzé V, Ankers P., 2014 - State-of-the-Art on Use of Insects as Animal Feed. *Anim. Feed Sci. Tech.*; 197 (11): 1-33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>;
240. Mariey YA, Samak HR, Ibrahim MA., 2012 - Effect of using *Spirulina platensis* algae as a feed additive for poultry diets: 1- productive and reproductive performances of local laying hens. *Egypt. Poult. Sci.*; 32 (1):201-215;
241. Martinez, SE; Chen, Y; Ho, EA; Martinez, SA; Davies, NM., 2015 - Pharmacological effects of a C-phycoerythrin-based multicomponent nutraceutical in an in-vitro canine chondrocyte model of osteoarthritis. *Can J Vet Res.*, 79:241–9. PMID: PMC4445518;
242. Masuda, T; Maekawa, T; Hidaka, K; Bando, H; Takeda, Y; Yamaguchi, H., 2001 - Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Curcumin: Analysis of Oxidative Coupling Products from Curcumin and Linoleate. *J Agric Food Chem.*, 49:2539–47. doi/10.1021/jf001442x;
243. McDonald, RE; Hultin, HO., 1987 - Some Characteristics of the Enzymic Lipid Peroxidation System in the Microsomal Fraction of Flounder Skeletal Muscle. *J Food Science.*, 52:15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb13964.x>;
244. Mehala, C; Moorthy, M., 2008 - Production performance of broilers fed with Aloe vera and *Curcuma longa* (Turmeric). *Int J Poult Sci.*, 7:852–6. doi: 10.3923/ijps.2008.852.856;
245. Merino-Guzmán R.; Latorre J. D.; Delgado R.; Xochitl H.-V.; Desha Wolfenden A.; Teague K. D.; Graham L. E.; Mahaffey B. D. M.; Baxter F. A.; Hargis B. M.; Tellez G., 2017 - Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Volume 7, Issue 2., Pages 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.021>;
246. Miller J K, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC., 1993 - Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.*; 76(9):2812-2823. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1;

247. Minhaj S.; Uddin A.; Lin L.; Namani A. ; Wang X. J. ; Tang X., 2007 - Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.*, Pages 585-597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>;
248. Minkova, KM; Tchernov, AA; Tchordadjieva, MI; Fournadjieva, ST; Antova, RE; Busheva, MCh., 2003 - Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *J Biotechnol.*, 102(1):55-9. doi: 10.1016/s0168-1656(03)00004-x;
249. Mirzaie, S; Zirak-Khattab, F; Hosseini, SA; Donyaei-Darian, H., 2018 - Effects of dietary *Spirulina* on antioxidant status, lipid profile, immune response and performance characteristics of broiler chickens reared under high ambient temperature. *Asian-Australas J Anim Sci.*, 31(4):556-563. doi: 10.5713/ajas.17.0483;
250. Miska Katarzyna B; Fetterer Raymond H; Wong Eric A., 2014 - mRNA expression of amino acid transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestine and liver of posthatch broiler chicks. *Poult Sci.*, 94(6):1323-32. doi: 10.3382/ps/pev059;
251. Moghaddam, HS; Emadi, M., 2014 - The effect of threonine and vitamin A on immune system in broiler chickens. *Int J Adv Biol Biomed Res.*, 26:756–63;
252. Mohamed S.A; El-Shishtawy R.M; Al-Bar O.A.M; Al-Najada A.R., 2017 - Chemical modification of curcumin: Solubility and antioxidant capacity. *Int. J. Food Prop.*, 20:718–724. doi: 10.1080/10942912.2016.1177545;
253. Mohan IK, Khan M, Shobha JC, Naidu MUC. et al., 2006 - Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by *Spirulina* in rats. *Cancer Chem. Pharm.*; 58(6): 802–808. doi: 10.1007/s00280-006-0231-8;
254. Mondal MA, Yeasmin T, Karim R, Nurealam Siddiqui M, Raihanun-Nabi SM, Sayed MA, Siddiky MNA., 2015 - Effect of dietary supplementation of turmeric (*Curcuma longa*) powder on the growth performance and carcass traits of broiler chicks. *SAARC Journal of Agriculture*; 13:188-199;
255. Mondal, M; Yeasmin, T; Karim, R; Siddiqui, MN; Nabi, SR; Sayed, M; et al., 2015 - Effect of dietary supplementation of turmeric (*Curcuma longa*) powder on the growth performance and carcass traits of broiler chicks. *SAARC Journal of Agriculture.*, 13(1), 188–199. <https://doi.org/10.3329/sja.v13i1.24191>;
256. Mottet, A; Tempio G., 2017 - Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Sci. J.*, 73:2, 245-256, doi: 10.1017/S0043933917000071 ;
257. Mountzouris K. C; Paraskeuas V. V.; Fegeros K., 2019 - Priming of intestinal cytoprotective genes and antioxidant capacity by dietary phytogetic inclusion in broilers. *Animal Nutrition Journal.*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.04.003>;
258. Moustafa, E.S.; Alsanie, W.F.; Gaber, A.; Kamel, N.N.; Alaqil, A.A.; Abbas, A.O., 2021 - Blue-Green Algae (*Spirulina platensis*) Alleviates the Negative Impact of Heat Stress on Broiler Production Performance and Redox Status. *Animals*, 11, 1243. <https://doi.org/10.3390/ani11051243>;
259. Naderi, M; Akbari, MR; Asadi-Khoshoei, E; Khaksar, K; Khajali, F., 2014 - Effects of Dietary Inclusion of Turmeric (*Curcuma longa*) and Cinnamon (*Cinnamomum verum*) Powders on Performance, Organs Relative Weight and Some Immune System Parameters in Broiler Chickens. *Poult Sci J.*, 2, 2, 153-163. doi: 10.22069/psj.2014.1963;

260. Namagirilakshmi S, Selvaraj P, Nanjappan K, Jayachandran S, Visha P, 2010 - Turmeric (*Curcuma longa*) as an alternative to in-feed antibiotic on the gut health of broiler chickens. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences*; 6:148-150;
261. Nasir R.; Naeem M.; Rui Y.; Zhong X.; Wang T., 2013 - Effect of Dietary Supplementation of Curcumin on Growth Performance, Intestinal Morphology and Nutrients Utilization of Broiler Chicks. *J. Poult. Sci.*, 50: 44-52, doi:10.2141/jpsa.0120065;
262. Nisarani K; S. Gowda; Ledoux D. R.; Rottinghaus G. E., Bermudez A. J.; Chen Y. C, 2009 - Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B1. *British Journal of Nutrition.*, 102, 1629–1634. doi:10.1017/S0007114509990869;
263. Nochi T.; Jansen C. A.; Toyomizu M.; van Eden W., 2018 - The Well-Developed Mucosal Immune Systems of Birds and Mammals Allow for Similar Approaches of Mucosal Vaccination in Both Types of Animals. *Front. Nutr.*, , Sec. Nutritional Immunology Volume 5. doi: 10.3389/fnut.2018.00060;
264. Nogal A.; Valdes A. M.; Mennia C., 2021 - The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut Microbes.*, 13(1). doi: 10.1080/19490976.2021.1897212;
265. Nouzarian, R; Tabeidian, S; Toghyani, M; Ghalamkari, G; Toghyani, M., V - Effect of turmeric powder on performance, carcass traits, humoral immune responses, and serum metabolites in broiler chickens. *J Anim Feed Sci.*, 20:389–400. <https://doi.org/10.22358/jafs/66194/2011> ;
266. Ogbuewu I.P; Mokolopi B.G; Mbajiorgu C.A., 2022 - Meta-analysis of growth performance indices of broiler chickens in response to turmeric (*Curcuma longa* L.) supplementation. *Animal Feed Science and Technology.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115155>;
267. Oke, OE., 2018 - Evaluation of physiological response and performance by supplementation of *Curcuma longa* in broiler feed under hot humid tropical climate. *Trop Anim Health Prod.*, 50(5):1071-77. doi: 10.1007/s11250-018-1532-8;
268. Olaizola, M., 2003 - Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol Eng.*, 20:459–66. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00076-5);
269. Olarotimi O. J., 2018 - Turmeric (*Curcuma Longa*): An Underutilized Phyto-genic Additive in Poultry Nutrition,.*Turkish Journal of Agriculture -Food Science and Technology.*, 6(1):102-106. doi.org/10.24925/turjaf.v6i1.102-106.1572;
270. Oliveira MACL, Monteiro MPC, Robbs PG, Leite SGF., 1999 - Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*; 7:261-275;
271. Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Drew MD., 2006 -Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Research in Veterinary Science*; 81:99-108;
272. Olnood, CG; Beski, SSM; Choct, M; Iji, PA., 2015 - Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. *Anim Nutr.*, 1(3):184-191. doi: 10.1016/j.aninu.2015.07.003;

273. Omar, A. E.; Al-Khalaifah, H. S.; Osman, A.; Gouda, A.; Shalaby, S. I.; Roushdy, E. M.; Abdo, S. A.; Ali, S. A.; Hassan, A. M.; Amer, S. A., 2022 -Modulating the Growth, Antioxidant Activity, and Immunoexpression of Proinflammatory Cytokines and Apoptotic Proteins in Broiler Chickens by Adding Dietary *Spirulina Platensis* Phycocyanin. *Antioxidants*, , 11 (5), 991. <https://doi.org/10.3390/antiox11050991>;
274. Ozkan O.; Betty, L; Black C.; Ashwell M.; Christian K. T.; Russell J. Borski; Brenda J. G., 2010 - Developmental Profile of Claudin-3, -5, and -16 Proteins in the Epithelium of Chick Intestine. *The Anatomical Record*., 293:1175–1183. <https://doi.org/10.1002/ar.21163>;
275. Pandav P. V.; Puranik P., 2015 - Trials on metal enriched *Spirulina platensis* supplementation on poultry growth., *G.J.B.B*, VOL.4 (1) : 128-134, ISSN 2278 – 9103;
276. Park E, Chun HS., 2017 - Protective effects of curcumin on manganese-induced BV-2 microglial cell death. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 40:1275-1281;
277. Park, JH; Lee, SI; Kim, IH., 2018 - Effect of dietary *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* on the growth performance, antioxidant enzyme activity, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and breast meat quality of broiler chickens. *Poult Sci.*, 97(7):2451-2459. doi: 10.3382/ps/pey093;
278. Park, S-S; Kim, J-M; Kim, E-J; Kim, H-S; An, B-K; Kang, C-W., 2012 - Effects of Dietary Turmeric Powder on Laying Performance and Egg Qualities in Laying Hens. *Korean J Poult Sci.*, 39:27–32. doi: 10.5536/KJPS.2012.39.1.027;
279. Pascariu, S. M; Pop, I. M; Simeanu, D; Pavel, G; Solcan, C., 2017 -Effects of wine by-products on growth performance, complete blood count and total antioxidant status in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science.*, 19, 191-202;
280. Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Leonel FR. et al., 2004 - Productive traits of broiler chicken fed diets containing different growth promoters. *Bras.J. Poult. Sci.*; 6 (3): 177-182. DOI:10.1590/S1516-635X2004000300008;
281. Pieper, GM; Jordan, M; Dondlinger, LA; Adams, MB; Roza, AM., 1995 - Peroxidative Stress in Diabetic Blood Vessels: Reversal by Pancreatic Islet Transplantation. *Diabetes.*, 44(8):884-9. doi: 10.2337/diab.44.8.884;
282. Pietrzak B.; Tomela K.; Olejnik-Schmidt A.; Mackiewicz A., Schmidt M., 2020 - Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *Int J Mol Sci.*, 21(23):9254. doi: 10.3390/ijms21239254;
283. Pignanelli C; Ma D; Noel M; Ropat J; Mansour F; Curran C; Pupulin S., 2017 - Selective Targeting of Cancer Cells by Oxidative Vulnerabilities with Novel Curcumin Analogs. *Sci. Rep.*, 7:1105. doi: 10.1038/s41598-017-01230-4;
284. Piñero Estrada, JE; Bermejo Bescós, P; Villar del Fresno, AM., 2001 -Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco.*, 56(5-7):497-500. doi: 10.1016/s0014-827x(01)01084-9;
285. Piyush D.; Akanksha A.; Jaishal P.; Poonam C.; Shital R.; Mandeep K.; Akanksha S.; Jatinder K.; Ashok K. Y.; Vikas S.; Adukamparai R.; Suresh B.; Sanjay K. B. ,Gurpal S., Ravi P., 2023 - Barnwal. Immune Control of Avian Influenza Virus Infection and Its Vaccine Development. *Vaccines.*, 11(3), 593; doi.org/10.3390/vaccines1103059;

286. Pop LM, Tăbăran AF, Paștiu AI, Kalmár Z. et al., 2019 - Immune response of broiler chickens fed diets supplemented with artemisinin. *Rom Biotechnol Lett.*; 24(3): 425-431. DOI: 10.25083/rbl/24.3/425.431;
287. Prakash, P.; Radha; Kumar, M.; Kumari, N.; Prakash, S.; Rathour, S.; Thakur, M.; Jamwal, R.; Janjua, S.; Ali, M.; et al., 2021 - Therapeutic Uses of Wild Plants by Rural Inhabitants of Maraog Region in District Shimla, Himachal Pradesh, India. *Horticulturae.*, 7, 343. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100343>;
288. Prakash, P.; Radha; Kumar, M.; Pundir, A.; Puri, S.; Prakash, S.; Kumari, N.; Thakur, M.; Rathour, S.; Jamwal, R.; et al., 2021 - Documentation of Commonly Used Ethnoveterinary Medicines from Wild Plants of the High Mountains in Shimla District, Himachal Pradesh, India. *Horticulturae.*, 7, 351. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100351>;
289. Prasad, S; Tyagi, A.K; Aggarwal, B.B., 2014 - Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. *Cancer Res. Treat.* , 46:2–18;
290. Priyadarsini, K.I., 2014 - The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules.*, 19:20091–20112. doi:10.3390/molecules191220091;
291. Priyadarsini, KI., 1997 - Free Radical Reactions of Curcumin in Membrane Models. *Free Radic Biol Med.*, 23(6):838-43. doi: 10.1016/s0891-5849(97)00026-9;
292. Puqiao, L.; Saskia B.; Garssen J.; Wichers H. J.; Folkerts G.; Fink-Gremmels J.; Varasteh S., 2020 - Beyond Heat Stress: Intestinal Integrity Disruption and Mechanism-Based Intervention Strategies. *Nutrients.*, 12(3):734. DOI:10.3390/nu12030734;
293. Puvača N.; Dragana L.; Čabarkapa I.; Đuragic O.; Popović S.; Prodanović R.; Bošković J., 2018 - Effects of Turmeric Powder (*Curcuma Longa*) in Broiler Nutrition: Coccidiosis and Antioxidative Status, *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*. DOI: 10.32474/CDVS.2018.02.000128;
294. Qasem M, Alhadj M, Jer El Nabi A, Al-Mufarrej S., 2016 - Effects of dietary supplement of turmeric powder (*Curcuma longa*) on blood biochemistry parameters and antioxidant activity in chickens. *SA J An Sci.*, 46:204. doi: 10.4314/sajas.v46i2.12 ;
295. Qureshi, MA; Garlich, JD; Kidd, MT., 1996 - Dietary *Spirulina Platensis* Enhances Humoral and Cell-Mediated Immune Functions in Chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 18(3):465-76. doi: 10.3109/08923979609052748;
296. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al., 2014 - Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res Int.*, Article ID 761264, <https://doi.org/10.1155/2014/761264> ;
297. Rahayu, W; Tjiptasurasa, S; Indriyani, D., 2015 - *Curcuma xanthorrhiza*. *J Far Indonesia.*, 6:2–4;
298. Raheem, MA; Jiangang, H; Yin, D; Xue, M; Rehman, K ur; Rahim, MA; et al., 2021 - Response of lymphatic tissues to natural feed additives, curcumin (*Curcuma longa*) and black cumin seeds (*Nigella sativa*), in broilers against *Pasteurella multocida*. *Poult Sci.*, 100:101005. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.01.028>;
299. Rahmani, M; Golian, A; Kermanshahi, H; Reza Bassami, M., 2017 - Effects of curcumin or nanocurcumin on blood biochemical parameters, intestinal morphology and microbial

population of broiler chickens reared under normal and cold stress conditions. *J Appl Anim Res.*, 46:1, 200-209, doi: 10.1080/09712119.2017.1284077 ;

300. Rajput, N; Muhammad, N; Yan, R; Zhong, X; Wang, T., 2013 - Effect of Dietary Supplementation of Curcumin on Growth Performance, Intestinal Morphology and Nutrients Utilization of Broiler Chicks. *J Poult Sci.*, 50:44–52. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0120065>;

301. Rao, DS; Sekhara, NC; Satyanarayana, MN; Srinivasan, M., 1970 - Effect of Curcumin on Serum and Liver Cholesterol Levels in the Rat. *J Nutr.*, 100(11):1307-15. doi: 10.1093/jn/100.11.1307;

302. Rasool, M; Sabina, EP; Lavanya, B., 2006 - Anti-inflammatory Effect of *Spirulina fusiformis* on Adjuvant-Induced Arthritis in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.*, 29:2483–7. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2483> ;

303. Ravindran, V., 2013 - Poultry feed availability and nutrition in developing countries. *FAO, Poultry development review.*, 2:60–3;

304. Reddy, CM; Bhat, VB; Kiranmai, G; Reddy, MN; Reddanna, P; Madyastha, KM., 2000 - Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by C-Phycocyanin, a Biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 277(3):599-603. doi: 10.1006/bbrc.2000.3725;

305. Rehman, HU; Vahjen, W; Awad, WA; Zentek, J., 2007 - Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch nim Nutr.*, 61:319–35. 10.1080/17450390701556817;

306. Reilly P, O'Doherty JV, Pierce KM, Callan JJ. et al., 2008 - The Effects of Seaweed Extract Inclusion on Gut Morphology, Selected Intestinal Microbiota, Nutrient Digestibility, Volatile Fatty Acid Concentrations and the Immune Status of the Weaned Pig. *Animal.*; 2 (10): 1465-1473. doi: 10.1017/S1751731108002711;

307. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M.. 2005 - A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*; 435:948-953;

308. Remadevi, R; Surendran, E; Kimura, T (eds)., 2007 - Turmeric in traditional medicine. *Turmeric: the genus Curcuma*. CRC Press;409–36, ISBN 9780849370342;

309. Ribeiro R.; Alvarenga P. B.; Vinícius de Souza R.; Cantarelli M. G.; Zangeronimo J.; da Silva W.; da Silva J. L. R.; dos Santos L. M.; Pereira L. J., 2011 - Energy values and chemical composition of spirulina (*Spirulina platensis*) evaluated with broilers, *R. Bras. Zootec.*, doi.org/10.1590/S1516-35982011000500008;

310. Rice-Evans, C; Miller, NJ., 1994 - Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.*, 234:279-93. doi: 10.1016/0076-6879(94)34095-1;

311. Rinttilä, T; Apajalahti, J., V - Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance, *J Appl Poult Res.*, 22: 3, 647-58, <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00742>;

312. Robinson K.; Deng Z.; Hou Y.; Zhang Z., 2015 - Regulation of the Intestinal Barrier Function by Host Defense Peptides. *Front. Vet. Sci.*. doi.org/10.3389/fvets.2015.00057;

313. Romay, C; Ledón, N; González, R., 1998 - Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res.*, 47(8):334-8. doi: 10.1007/s000110050338;

314. Romy, Ch; Gonzalez, R; Ledon, N; Ramirez, D; Rimbau, V., 2003 - C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Curr Protein Pept Sci.*, 4(3):207-16. doi: 10.2174/1389203033487216;
315. Ross E, Dominy W., 1990 - The nutritional value of dehydrated blue-green algae (*Spirulina platensis*) for poultry. *Poult. Sci.*; 69 (5): 794-800. doi: 10.3382/ps.0690794;
316. Rotaru A., 2016 - Impactul remediului BioR asupra statusului pro - antioxidant la puii de carne și prepelițe. Teză de doctorat, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chisinau;
317. Rudic, V.; Gudumac, V.; Diug, E. et al., 2004 - Tehnologia de obținere a produsului BioR și studii privind acțiunea imunomodulatoare in vitro a acestuia. *Anuarul științific al Universității de Stat de Medicină și Farmacie "N. Testemițanu"* ed. 5, Chișinău;Moldova, p.138-144 ;
318. S. M. Tamam; H. M. Madbouly; Fadwa Amin. Antiviral activity of *Curcuma longa* against Newcastle disease virus (in vitro and in vivo studies). *VET. MED.J. 6 TH SCI. CONF. VOL. 20, NO.1, P.290-295*;
319. Saeed M, Kamboh AA, Syed SF, Babazadeh D, Suheryani I, Shah QA, Umar M, Kakar I, Naveed M, Abd El-Hack ME, Alagawany M., 2018 - Phytochemistry and beneficial impacts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a dietary supplement in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*; 74: 331-346;
320. Saeed M, Khan MS, Amir K, Bi JB, Asif M, Madni A, Kamboh AA, Manzoor Z, Younas U, Chao S., 2022 - *Lagenaria siceraria* fruit: A review of its phytochemistry, pharmacology, and promising traditional uses. *Frontiers in nutrition*; 9: 927361;
321. Saeed M, Khan MS, Kamboh AA, Alagawany M, Khafaga AF, Noreldin AE, Qumar M, Safdar M, Hussain M, Abd El-Hack ME, Chao S., 2020 - L-theanine: an astounding sui generis amino acid in poultry nutrition. *Poultry science*; 99: 5625-5636;
322. Saeed M, Naveed M, Arif M, Kakar MU, Manzoor R, Abd El-Hack ME, Alagawany M, Tiwari R, Khandia R, Munjal A, Karthik K., 2017 - Green tea (*Camellia sinensis*) and l-theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans - A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 95: 1260-1275;
323. Saeed M, Yatao X, Hassan F, Arain MA, Abd El-Hack ME, Noreldin AE, Sun C., 2018 - Influence of graded levels of l-theanine dietary supplementation on growth performance, carcass traits, meat quality, organs histomorphometry, blood chemistry and immune response of broiler chickens. *International Journal of Molecular Sciences*; 19: 462;
324. Saeed M, Yatao X, Tiantian Z, Qian R, Sun C., 2019 - 16S ribosomal RNA sequencing reveals a modulation of intestinal microbiome and immune response by dietary L-theanine supplementation in broiler chickens. *Poultry science*; 98: 842-854;
325. Safari R, Raftani Amiri Z, Esmailzadeh Kenari R., 2020 - Antioxidant and antibacterial activities of C-phycocyanin from common name *Spirulina platensis*. *IJFS.*, 19 (4) :1911-27.
326. Saha S.; Buttari B.; Panieri E.; Profumo E.; Saso L., 2020 - An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules.*, 25(22), 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>;
327. Saini, MK; Vaish, V; Sanyal, SN., 2013 - Role of cytokines and Jak3/Stat3 signaling in the 1, 2-Dimethylhydrazine Dihydrochloride-induced rat model of colon carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention.*, 22:215–28;

328. Saleena, LAK; Chandran, D; Rayirath, G; Shanavas, A; Rajalingam, S; Vishvanathan, M; et al., 2022 - Development of Low-calorie Functional Yoghurt by Incorporating Mannitol Producing Lactic Acid Bacteria (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) in the Standard Yoghurt Culture. *J Pure Appl Microbiol.*, 16(1):729-36. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.1.78>;
329. Samanya M, Yamauchi K., 2002 - Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*; 133:95-104;
330. Samarasinghe, K; Wenk, C; Silva, KFST; Gunasekera., 2003 - Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannanoligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chicken diets. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences. JMDM.*, 16:1495-1500;
331. Sandur, SK; Pandey, MK; Sung, B; Ahn, KS; Murakami, A; Sethi, G; et al., 2007 - Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis.*, 28:1765–73. doi/10.1093/carcin/bgm123;
332. Sasi, M.; Kumar, S.; Kumar, M.; Thapa, S.; Prajapati, U.; Tak, Y.; Changan, S.; Saurabh, V.; Kumari, S.; Kumar, A.; et al., 2021 - Garlic (*Allium sativum* L.) Bioactives and Its Role in Alleviating Oral Pathologies. *Antioxidants*, 10, 1847. <https://doi.org/10.3390/antiox10111847>;
333. Schneeman, T.A; M.E. Bruno; H.Schjerven; F.E. Johansen., 2005 - Regulation of the polymeric Ig rec ptor by signaling through Toll-like receptors 3 and 4: linking innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.*,175, pp. 376-384;
334. Schoultz, Ida; Åsa V. Keita., 2020 - The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells.*, 9(8): 1909. doi: 10.3390/cells9081909;
335. Selim S; Hussein E; Abou-Elkhair R., 2018 - Einfluss von *Spirulina platensis* als Futterzusatzstoff auf die Legeleistung die Eiqualität und den Leberschutz von Legehennen. *Europ.Poult.Sci.*, 82.. ISSN 1612-9199. DOI: 10.1399/eps.2018.227;
336. Seo, K-I; Choi, M-S; Jung, UJ; Kim, H-J; Yeo, J; Jeon, S-M; et al., 2008 - Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. *Mol Nutr Food Res.*, 52:995–1004. doi/10.1002/mnfr.200700184;
337. Shanmugapriya B, Saravana Babu S., 2014 - Supplementary effect of *Spirulina platensis* on performance, hematology and carcass yield of broiler chicken. *Indian Streams Res J.*, 4:1–7;
338. Shehzad, A; Rehman, G; Lee, YS., 2013 - Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors.*, 39:69–77. doi/10.1002/biof.1066;
339. Shih, C-M; Cheng, S-N; Wong, C-S; Kuo, Y-L; Chou, T-C., 2009 - Antiinflammatory and Antihyperalgesic Activity of C-Phycocyanin. *Anesth Analg.*, 108(4):1303-10. doi: 10.1213/ane.0b013e318193e919;
340. Shohe, A; Vidyarthi, V; Zuyie, R., 2019 - Performance of broiler chicken on diet supplemented with Turmeric powder (*Curcuma longa*). *Livestock Res. Int.*, 7:77–82;
341. Seo, CC; Abdullah, N; Tan, WS; Ho, YW., 2005 - Influence of β -glucanase-producing *Lactobacillus* strains on intestinal characteristics and feed passage rate of broiler chickens. *Poult Sci.*, 84:734–41. <https://doi.org/10.1093/ps/84.5.734>;

342. Singh, RK; Rai, D; Yadav, D; Bhargava, A; Balzarini, J; De Clercq, E., 2010 - Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *Eur J Med Chem.*, 45(3):1078-86. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.12.002;
343. Slack, E.; M.L. Balmer; J.H. Fritz., 2012 - Hapfelmeier Functional flexibility of intestinal IgA: Broadening the fine line. *Front. Immunol.*3., pp. 1-10;
344. Smirnova, M.G.; L. Guo; J.P.Birchall, J.P., 2003 - Pearson LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol*, 221., pp. 42-49;
345. SMITH L. A., Beal R., 2008 - The Avian Enteric Immune System In Health And Disease. *Avian Immunology.*, Pages 243-271. DOI:10.1016/B978-012370634-8.50016-0;
346. Sobh, R.A; Mohamed W.S; Moustafa A.B; Nasr H.E., V - Encapsulation of Curcumin and Curcumin Derivative in Polymeric Nanospheres. *Polymer-Plastics Tech. Eng.*, 54:1457–1467. doi: 10.1080/03602559.2014.1003230;
347. Solcan C., 2015 - Cercetări morfologice asupra țesutului limfoid asociat mucoaselor la găină (*Gallus domestica*). Teză de doctorat, FMV Iași;
348. Solcan C., 2018 - Histologie Veterinară. Ed. Ion Ionescu de la Brad Iași, ;
349. Solcan C; M. Gogu; V. Floristean; B. Oprisan; G. Solcan., 2013 - The hepatoprotective effect of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries on induced aflatoxin B1 poisoning in chickens. *Poultry Science.*, 92(4):966-974. doi: 10.3382/ps.2012-02572;
350. Soomro, RN; Abd El-Hack, ME; Shah, SS; Taha, AE; Alagawany, M; Swelum, AA; et al., V - Impact of restricting feed and probiotic supplementation on growth performance, mortality and carcass traits of meat-type quails. *Anim Sci J.*, 90:1388–95. <https://doi.org/10.1111/asj.13290>;
351. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A., 2006 - Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.*, 101:87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>;
352. Steiner T., 2006 - The potential benefits of Natural Growth Promoters. *Feed Tech.*;10(2): 26;
353. Sugiharto S, Isroli I, Widiastuti E, Prabowo NS., 2011 - Effect of turmeric extract on blood parameters, feed efficiency and abdominal fat content in broilers. *J Indonesian Trop Anim Agric.*, 36:21–6. <https://doi.org/10.14710/jitaa.36.1.21-26>;
354. Sugiharto S; Yudiarti T; Isroli I; Widiastuti E., 2018 - Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler chicks. *South African Journal of Animal Science.*, 48 (No. 1);
355. Sugiharto, S., 2016 - Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *J Saudi Soc Agr Sci.*, 15:99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>;
356. Sugiharto, S., 2020 - Alleviation of heat stress in broiler chicken using turmeric (*Curcuma longa*) - a short review. *J. Anim. Behav. Biometeorol.*, 8:3, 215-22, <http://dx.doi.org/10.31893/jabb.20028>;
357. Sugiharto, S; Yudiarti, T; Isroli, I; Widiastuti, E., 2018 - Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler chicks. *SA J An Sci.*, 48:98. doi: 10.4314/sajas.v48i1.12;

358. Sumarsih Sri; Bambang Sulistiyanto; C. S. Utama., 2020 - Total Bacteria and The Gram-Positive and Negative Bacteria of Small Intestines Broilers in Starter Period With Different Methods of Giving Probiotics. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 518 012077. DOI 10.1088/1755-1315/518/1/012077;
359. Sun, M; Su, X; Ding, B; He, X; Liu, X; Yu, A; et al., 2012 - Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. Nanomedicine (Lond)., 7(7):1085-100. doi: 10.2217/nmm.12.80;
360. Surai P. F.; Fisinin V. I., 2015 - Antioxidant-Prooxidant Balance in the Intestine: Applications in Chick Placement and Pig Weaning. J Veter Sci Med.;3(1): 16;
361. Surai Peter F; Ivan I. K.; Michael T. K., 2021 - Redox Homeostasis in Poultry: Regulatory Roles of NF- κ B. Antioxidants., 10(2), 186. <https://doi.org/10.3390/antiox10020186>;
362. Tajodini, M; Saeedi, HR; Moghbeli, P., 2015 - Use of black pepper, cinnamon and turmeric as feed additives in the poultry industry, World's Poult Sci J., 71:1, 175-183, doi: 10.1017/S0043933915000148;
363. Tanvir, EM; Hossen, MdS; Hossain, MdF; Afroz, R; Gan, SH; Khalil, MdI; et al., 2017 - Antioxidant Properties of Popular Turmeric (*Curcuma longa*) Varieties from Bangladesh. J Food Quality., Article ID 8471785, <https://doi.org/10.1155/2017/8471785>;
364. Tasaki I, Takahashi N., 1966 - Absorption of Amino Acids from the Small Intestine of the Domestic Fowl. J. Nutr.; 88 (4): 359-364. DOI:10.1093/jn/88.4.359;
365. Tavernari, FDeC; Roza, LF; Surek, D; Sordi, C; Silva, MLBD; Albino, LFT; et al., 2018 - Apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of microalgae *Spirulina platensis* as an ingredient in broiler chicken diets. Br Poult Sci., 59(5):562-567. doi: 10.1080/00071668.2018.1496401;
366. Toyomizu M, Sato K, Taroda H, Kato T. et al., 2001 - Effects of Dietary *Spirulina* on Meat Colour in Muscle of Broiler Chickens. Brit. Poult. Sci.; 42 (2): 197-202. doi: 10.1080/00071660120048447;
367. Trinchieri, G; Childs, RW; Lanier LL. Functions of Natural Killer Cells. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press, OW; Burns, LJ; Caligiuri M. eds. Williams Hematology, 9e. McGraw Hill; 2015.
368. Turk. D.E., 1982 - The Anatomy of the Avian Digestive Tract as Related to Feed Utilization. Poultry Science. 61:1225-1244;
369. Tyagi, P; Singh, M; Kumari, H; Kumari, A; Mukhopadhyay, K., 2015 - Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. PLoS One., 10(3):e0121313;
370. Uddin, M.J; Kaewmala, K; Tesfaye, D.; Tholen E; Looft, C; Hoelker M; Karl Schellander, K; Cinar, M.U., 2013 - Expression patterns of porcine Toll-like receptors family set of genes (TLR1-10) in gut associated lymphoid tissues alter with age. Res. Vet. Sci., 95(1): 92-102;
371. Uni Z; Platin R; Sklan D., 1988 - Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. JComp Physiol B., 168:241-247;
372. Upasani CD, Balaraman R., 2003 - Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. Phytother. Res.;17 (4): 330- 334. DOI:10.1002/ptr.1135;

373. Ürüšan, H; Bölükbaşı, C., 2020 - The Influence of Turmeric Powder (*Curcuma longa*) on Fatty Acid Composition and Shelf Life of Broiler Chicken Meat. *Alinteri Zirai Bilimler Dergisi.*, 35:29–35. doi/10.28955/alinterizbd.737995;
374. Vafaiepour, Z; Razavi, BM; Hosseinzadeh, H., 2022 - Effects of turmeric (*Curcuma longa*) and its constituent (curcumin) on the metabolic syndrome: An updated review. *J Integr Med.*, 20(3):193-203. doi: 10.1016/j.joim.2022.02.008;
375. Van Doan, H; Hoseinifar, SH; Hung, TQ; Lumsangkul, C; Jaturasitha, S; Ehab El-Haroun, et al., 2020 - Dietary inclusion of chestnut (*Castanea sativa*) polyphenols to Nile tilapia reared in biofloc technology: Impacts on growth, immunity, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol.*, 105:319-326. doi: 10.1016/j.fsi.2020.07.010;
376. Velten, S; Neumann, C; Bleyer, M; Gruber-Dujardin, E; Hanuszewska, M; Przybylska-Gornowicz, B; et al., 2018 - Effects of 50 Percent Substitution of Soybean Meal by Alternative Proteins from *Hermetia illucens* or *Spirulina platensis* in Meat-Type Chicken Diets with Graded Amino Acid Supply. *Anim Sci.*, 08:119–36. doi:10.4236/ojas.2018.82009;
377. Visek WJ., 1978 - The mode of growth promotion by antibiotics. *Journal of Animal Science*; 46:1447-1469;
378. Viveros, A; Chamorro, S; Pizarro, M; Arija, I; Centeno, C; Brenes, A., 2011 - Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult Sci.*, 90:566–578. doi: 10.3382/ps.2010-00889;
379. Vorobyov E, Horst J., 2006 - Getting the proto-Pax by the tail. *Journal of Molecular Evolution*; 63:153-164;
380. Waite, DW; Taylor, M., 2015 - Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Front Microbiol.*, 6:673.DOI: 10.3389/fmicb.2015.00673;
381. Walker WA, Duff LC., 1998 - Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.*; 9:668-675;
382. Wang JX, Peng KM., 2008 - Developmental morphology of the small intestine of African ostrich chicks. *Poultry Science*; 87:2629-2635;
383. Wang, D; Huang, H; Zhou, L; Li, W; Zhou, H; Hou, G; et al., 2015 - Effects of Dietary Supplementation with Turmeric Rhizome Extract on Growth Performance, Carcass Characteristics, Antioxidant Capability, and Meat Quality of Wenchang Broiler Chickens. *Ital J Anim Sci.*, 14:3, doi: 10.4081/ijas.2015.3870;
384. Wang, R; Li, D; Bourne, S., 1998 - Can 2000 years of herbal medicine history help us solve problems in the year 2000. In: *Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium (AAS'98)*. Kentucky., p 273–291;
385. Watanabe H.; Kunihiro K.; Isayama Y., 1975 - Peculiar Secretory IgA System Identified in Chickens: II. Identification and Distribution of Free Secretory Component and Immunoglobulins of IgA, IgM, and IgG in Chicken External Secretions. *J Immunol.*, 115 (4): 998–1001. doi.org/10.4049/jimmunol.115.4.998;
386. Wecke C, Liebert F., 2013 - Improving the Reliability of Optimal In-Feed Amino Acid Ratios Based on Individual Amino Acid Efficiency Data from N Balance Studies in Growing Chicken. *Animals.*; 3 (3): 558-573. doi:10.3390/ani3030558;

387. Weisburg, WG; Barns, SM; Pelletier, DA; Lane, 1991 - DJf.16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173:697–703. 10.1128/jb.173.2.697-703;
388. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismaysch A., 2008 - Use of phyogenic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci.*, 86:140–8. doi: 10.2527/jas.2007-0459;
389. Windisch, W; Kroismayr, A., 2006 - The Effects of Phytobiotics on Performance and Gut Function in Monogastrics., Available online at: <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/phytobiotics-on-performance-gut-function-in-monogastrics-t33528.htm>;
390. Wu, Q; Liu, L; Miron, A; Klímová, B; Wan, D; Kuča, K., 2016 - The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Arch Toxicol.*, 90(8):1817-40. doi: 10.1007/s00204-016-1744-5.
391. Xalxo, RK; Sao, S; Sahu, PK., 2013 - Effect of antibacterial properties of cyanobacterial *Spirulina platensis*. *Int J Pharm & Life Sci.*;4;
392. Xie Z, Shen G, Wang Y, Wu C., 2019 - Curcumin supplementation regulates lipid metabolism in broiler chickens. *Poult Sci.*, 98(1):422-429. doi: 10.3382/ps/pey315;
393. Yadav, S; Jha, R., 2019 - Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *J Animal Sci Biotechnol.*, 10, 2. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0310-9>;
394. Yamauchi K, Iida S, Isshiki Y., 1992 - Post-hatching developmental changes in the ultrastructure of the duodenal absorptive epithelial cells in 1, 10 and 60-d-old chickens, with special reference to mitochondria. *British Poultry Science*; 33:475-488;
395. Yarru, LP; Settivari, RS; Gowda, NKS; Antoniou, E; Ledoux, DR; Rottinghaus, GE., 2009 - Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult Sci.*, 88(12):2620-7. doi: 10.3382/ps.2009-00204;
396. Ye R.; Huang J.; Wang Z.; Chen Y.; Dong Y., 2021 - Trace Element Selenium Effectively Alleviates Intestinal Diseases. *Int J Mol Sci.*, 22(21): 11708. doi: 10.3390/ijms222111708;
397. Yegani M, Korver DR., 2008 - Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. *Poult Sci.*, 87:10, 2052-63, <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>.
398. Yeoman, CJ; Chia, N; Jeraldo, P; Sipos, M; Goldenfeld, ND, White, BA., 2012 - The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev.*, 13:89–99. 10.1017/S1;
399. Yoo S, Kim K, Nam H, Lee D., 2018 - Discovering health benefits of phytochemicals with integrated analysis of the molecular network, chemical properties and ethnopharmacological evidence. *Nutrients*; 10:1042;
400. Yoon WJ, Kim SS, Oh TH, Lee NH, Hyun CG., 2009 - *Cryptomeria japonica* essential oil inhibits the growth of drug-resistant skin pathogens and LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Polish Journal of Microbiology* ; 58:61-68;
401. Yoshida M, Hoshii H., 1980 - Nutritive value of *Spirulina*, green algae, for poultry feed. *Japan. Poultry Sci.*; 17 (1): 27-30. <https://doi.org/10.2141/jpsa.17.27>;
402. Youn Y. J.; Groer M.; Valeria S.; Dutra O.; Sarkar A.; McSkimming D. I., 2020 - Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms.*, 8(10), 1587. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101587>;

403. Younus, H., 2018 - Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*., 12:88–93. PMID: 29896077;
404. Yue S.; Kumar S.; Oakley B.; Kim W. K., 2018 - Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Front. Vet. Sci. Sec. Animal Nutrition and Metabolism*., doi.org/10.3389/fvets.2018.00254;
405. Yun X.; Miao J.; Zhang Y.; Zhang H.; Kong L.; Seviour R.; Kong Y., 2021 - Dietary inulin supplementation modulates the composition and activities of carbohydrate-metabolizing organisms in the cecal microbiota of broiler chickens. *PLoS One*., 16(10), doi: 10.1371/journal.pone.0258663;
406. Yusuf, M. S.; Hassan, M. A.; Abdel-Daim, M. M.; El nabtiti, A. S.; Ahmed, A. M.; Moawed, S. A.; El-Sayed, A. K.; Cui, H., 2016 - Value Added by *Spirulina Platensis* in Two Different Diets on Growth Performance, Gut Microbiota, and Meat Quality of Japanese Quails. *Vet World*., 9 (11), 1287–1293. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1287-1293>;
407. Zhang J, Xu L, Zhang L, Ying Z, Su W, Wang T., 2014 - Curcumin attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury and mitochondrial dysfunction in mice. *Journal of Nutrition*; 144:1211-1218;
408. Zhang, J; Hou, X; Ahmad, H; Zhang, H; Zhang, L; Wang, T., 2014 -Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem.*, 15;145:57-65. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.025;
409. Zheng, B; Peng, S; Zhang, X, McClements, D.J., 2018 - Impact of Delivery System Type on Curcumin Bioaccessibility: Comparison of Curcumin-Loaded Nanoemulsions with Commercial Curcumin Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 66:10816–10826. doi:10.1021/acs.jafc.8b03174;
410. Zhou Y, Zhag T, Wang X, Wei X, Chen Y, Guo L, Zhang J, Wang C., 2015 - Curcumin modulates macrophage polarization through the inhibition of the toll-like receptor 4 expression and its signaling pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*; 36:631-641;
411. Zia A, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, Samarghandian S., 2021 - The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 134:111119.

Anexa 1. Lista de figuri

1.	Figura 1.1. Pui în prima săptămână de viață-LE1;	59
2.	Figura 1.2. Pui de o zi-LE2;	59
3.	Figura 1.3. Dieta de bază+20g turmeric ce urmau a fi omogenizate;	59
4.	Figura 1.4. Pui -14 zile-LE1;.....	59
5.	Figura 1.5. Pui- 22 zile-LE3;.....	59
6.	Figura 2.1. Duodenul puilor din Lotul Control. Duodenul puilor din Lotul Control. Vilozitatile intestinale sunt subtiri cu edem si desprinderea epiteliului in zona apexului. -Colorație HEA x40;	65
7.	Figura 2.2. Pretele duodenului la lotul martor Pretele duodenului la lotul martor. Polul luminal al vilozitatilor intestinal se distinge foarte greu datorita desprinderii acestora si a continului luminal cu care se intrepatrunde. Col HE x100;.....	65
8.	Figura 2.3. Duodenum from the Control Lot. In the axis of the intestinal villi and periglandular infiltrate with lymphocytes, oedema, sometimes rupture of the epithelial barium is observed. -HEA stain x400;	65
9.	Figura 2.4. Duoden LE1. Vilozitati intestinale vizibile, mai integre decat la lotul control. Se pot observa unele desprinse in polul luminal Colorație HEA x100;	66
10.	Figura 2.5. Vilozități acoperite de epiteliu columnar format din enterocite si celule caliciforme frecvente. Colorație HEA;	66
11.	Figura 2.6. Duoden LE1 Straturile circular intern, ingrosat si longitudinal extern al musculoasei.-Colorație HEA;	66
12.	Figura 2.7. Duoden LE2 Vilozitatile intestinale sunt lungi, au diametru redus, epiteliul columnar care-si pastreaza integritatea, adancimea criptelor este reusa, Tunica musculara este subtire comparativ cu a lotului control -Colorație HEAx100;.....	67
13.	Figura 2.8. Vilozitati intestinale de la lotul E2, duoden. In axul vilozitatilor intestinale de la E2, duoden, se eobserva infiltrat limfocitar redus in lamina propria sipe alocuri limfocite intraepiteliale. Col HE x400;.....	67
14.	Figura 2.9. Duoden LE2 – Tunica musculară. Tunica musculară cu stratul circular intern ceva mai subtire comparativ cu lotul control.-Colorație HEAx400;	67
15.	Figura 2.10. Duoden LE3-Vilozitatile intestinale sunt lungi, au diametru care variaza, epiteliul columnar care-si pastreaza integritatea partial, adancimea criptelor este reusa, Tunica musculara este subtire comparativ cu a lotului control. Colorație HEA;	67
16.	Figura 2.11. Duoden LE3. Vilozitatile intestinale prezinta bariera epiteliala integra la baza, adancimea criptelor este medie comparativ cu a LE2;.....	68
17.	Figura 2.12. Duoden LE3. Tunica musculara cu stratul circular intern evident.-Colorație HEAx100.....	68
18.	Figura 2.13. Înălțimea vilozităților duodenale;.....	69
19.	Figura 2.14. Diametrul vilozităților duodenale;	69
20.	Figura 2.15. Adâncimea criptelor;.....	69
21.	Figura 2.16. Efectele curcuminei asupra intestinului;	69
22.	Figura 3.1. Expresia IL-6la nivelul mucoasei duodenului la lotul control se evidentiaza atat la nivelul epiteliului cat si in grupuri de cellule din lamina propria. Col IHC anti-IL-6 x100;	73
23.	Figura 3.2. Expresia TNFAIP8 la Lotul Control apare moderata spre intensa, intracitoplasmatica, atat la nivelul epiteliului cat si in lamina propria;	73
24.	Figura 3.3. Pax 7 la Lotul Control. Se remarca expresia intracitoplasmatica atat de la nivelul celulelor epiteliale si din lamina propria. Col IHC anti- Pax 7;	73
	Figura 3.4. Expresia IL-6 moderata spre redua in epiteliul duodenal al puilor din LE1. Col IHC anti IL-6 x100;	73

26.	Figura 3.5. Expresia TNFAIP8 in duodenul puilor din -LE1. Expresia TNFAIP8 in duodenul puilor din -LE1 este moderat, mai ales la nivelul epiteliului columnar. Col IHC anti TNFAIP8x100;	73
27.	Figura 3.6. Expresia Pax 7 la nivelul epiteliului duodenului de la -LE1 este moderat, citoplasmatica. Col anti -Pax7 x100;	73
28.	Figura 3.7. Expresia IL-6 este foarte redusă la nivelul epiteliului vilozitatilor intestinale ale LE2;	74
29.	Figura 3.8. Expresia TNFAIP8 este evidenta intracitoplasmatica desi integritatea epiteliului este pastrata in duodenul puilor din - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100;	74
30.	Figura 3.9. Expresia Pax 7se menține evidentă în duodenul puilor din LE2. Diametrul vilozitatilor este redus si se observă integritatea barierei epiteliale. Col anti Pax 7x100;	74
31.	Figura 3.10. Expresia IL-6 in duodenul puilor din LE3 este moderata, mai intense apare spre varful vilozitatilor intestinale care ulterior se desprind. Col IHC anti_IL-6 x100;	74
32.	Figura 3.11. Expresia TNFAIP8 este evidenta intracitoplasmaticadesi integritatea epiteliului este pastrata in duodenul puilor din - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100;	75
33.	Figura 3.12. Expresia Pax 7se mentine evidenta in duodenul puilor din LE2. Diametrul vilozitatilor este redus si se observa integritatea barierei epiteliale. Col anti Pax 7x100;	75
34.	Figura 3.13. Expresia intensă a p65 în mucoasa cecumului la puii din lotul control. Col IHCanti p65 x400;	77
35.	Figura 3.14. Expresia redusă a Nrf 2 în mucoasa cecumului la puii din lotul control;	77
36.	Figura 3.15. Expresia moderat intensă a p65 în mucoasa cecumului la puii din lotul exp 1. Col IHC anti p65 x400	77
37.	Figura 3.16. Expresia moderată a p65 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 1. Col IHC anti p65 x400;	77
38.	Figura 3.17. Expresia moderată a Nrf2 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 1. Col IHC anti Nrf2x400;	77
39.	Figura 3.18. Expresia intracitoplasmatică moderată spre intense a p65 în epiteliul mucoasei și vel glandular al cecumului la puii din LE 3. Col anti p65x400;	77
40.	Figura 3.19. Expresia redusă a p65 in mucoasa cecumului la puii din lotul E2. p65;	78
41.	Figura 3.20. Expresia intensă a Nrf2 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 2. Col IHC anti Nrf2x400;	78
42.	Figura 3.21. Expresia moderata a Nrf2 în mucoasa cecumului la puii din Lotul exp 3. Col IHC anti Nrf2x400;	78
43.	Figura 4.1. Figura Jejun de pui din lotul control. Vilozități intestinale joase cu cu aglomerari limfoepiteliale în lamina propria și intraepithelial. Spre polul luminal se remarcă desprinderea epiteliului columnar. Col HE x100;	82
44.	Figura 4.2. Jejunul, placa Payer, la lotul E1 prezintă vilozități mai joase iar in lamina propria aglomerări limfoepiteliale difuze cu rari limfonoduli. Col HEx100;	82
45.	Figura 4.3. Jejun, Placa Peyr la LE2 in care apar aglomerari limfoepiteliale si limfonoduli. Col HE x100;	82
46.	Figura 4.4. Jejun provenit de la LE3. Se remarca aglomerari limfoide in lamina propria, ruperea barierei epiteliale la polul luminal al mucoasei. Col HE x40;	82
47.	Figura 4.5. Amigdale cecale provenite de la lotul control. Se evidențiază aglomerari limfoepiteliale si limfonoduli de dimensiuni moderate. Vilozitățile intestinale prezintă pe alocuri edem si epiteliul columnar desprins Col HE x40;	83
48.	Figura 4.6. Amigdale cecale la LE1. Se evidențiază aglomerări limfoepiteliale și limfonoduli de dimensiuni moderate. Vilozitățile intestinale prezintă pe alocuri epiteliul columnar desprins Col HE x40;	83
49.	Figura 4.7. Amigdala cecală de la puii din LE2. Aglomerari limfoepiteliale in care se evidenziaza si mici limfonoduli. Bariera epiteliala de la polul luminal este integra. Col HE x400;	

50.	Figura 4.8. Amigdale cecale provenite de la puii din LE3. Aglomerările limfoepiteliale sunt prezente atât în lamina propria cât și în submucoasa, în interiorul lor se observă și limfonoduli mici. Vilozitățile intestinale sunt mai joase cu bariera epitelială integă;	83
51.	Figura 4.9. Câștigul în greutate (1-14 zile);.....	87
52.	Figura 4.10. Câștigul în greutate (14-28 zile);.....	87
53.	Figura 4.11. Câștigul în greutate (28-42 zile);.....	87
54.	Figura 4.12. Câștigul în greutate (1-42 zile);.....	87
55.	Figura 4.13. Consum hrană/pui 1-7 zile;	92
56.	Figura 4.14. Consum hrană 8-14 zile;	92
57.	Figura 4.15. Consum hrană 15 -21 zile;	92
58.	Figura 4.16. Consum hrană 22-28 zile;	92
59.	Figura 4.17. Consum hrană 29-42 zile;	93
60.	Figura 5.1. Duoden Lot Control Vilozitățile sunt lungi cu aspect foliat și în axul vilozităților se observă un infiltrat limfoid difuz -Colorație HEAx40;.....	101
61.	Figura 5.2. LE1 Duoden cu vilozitatile lungi, cu un diametru mai mare spre baza si redus spre polul luminal. Epiteliul columnar se desprinde in zona luminala a virfului vilozitatii. Col HEx40;...	101
62.	Figura 5.3. Duoden LE2. Vilozitati lungi cu un diametru îngust și cu infiltrate limfoid redus in axul lor Colorație HE x40;.....	101
63.	Figura 5.4. Duoden LE3 Vilozitati lungi cu un diametru redus și cu infiltrate limfoide in axul lor. ColorațieHEA x40;.....	101
64.	Figura 5.5. Duoden LE4 Col HEx100;.....	101
65.	Figura 5.6. Jejun Lot Control. Vilozitati lungi cu infiltratii limfoide difuze in axul vilozitatilor si periglandular ColorațieHEA x40;	101
66.	Figura 5.7. Jejun LE1 ColorațieHEA x40;	101
67.	Figura 5.8. Mucoasa jejunului de la LE2 prezintă infiltratii limfoide in lamina propria a ucoasei atat in axul vilozitatii cay si periglandular. Vilozitatile l polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HEx100;.....	101
68.	Figura 5.9. Mucoasa jejunului de la LE3 prezinta infiltratii limfoide in lamina propria a mucoasei atat in axul vilozitatii dar si aglomerari mari periglandular. Vilozitatile l polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HEx100;.....	101
69.	Figura 5.10. Jejun LE4- Colorație HEx100. Vilozitățicu polul luminal care prezintă epiteliul desprins, infiltrații limfoide reduse în axul vilozităților și periglandular ColorațieHEx100;	102
70.	Figura 5.11. Mucoasa ileonului de la lotul control prezinta infiltratii limfoide reduse in lamina propria a mucoasei atat in axul vilozitatii cat si periglandular. Vilozitatile la polul luminal au un diametru mic. Col HEx100;	102
71.	Figura 5.12. Mucoasa ileonului de la LE1 prezinta infiltratii limfoide reduse, dispuse difuz in lamina propria a mucoasei atat in axul vilozitatii. Vilozitatile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col Hex100;	102
72.	Figura 5.13. Mucoasa ileonului de la LE2 prezinta infiltratii limfoide mari in lamina propria a mucoasei si periglandular. Vilozitatile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col Hex100;	102
73.	Figura 5.14. Mucoasa ileonului de la LE3 prezinta infiltratii limfoide mari in lamina propria a mucoasei periglandular. Vilozitatile la polul luminal au epiteliul columnar desprins. Col HEx100; .	102
74.	Figura 5.15. Mucoasa ileonului de la LE4 vilozitățile de polul luminal cu epiteliul columnar desprins. Col HEx100;.....	102
75.	Figura 5.16. CECUM Lot C -Epiteliul de suprafață desprins iar cel glandular prezint limfocite intraepiteliale Colorație Hex400;.....	102
76.	Figura 5.17. Cecum provenit de la LE1. Se evidentiaza integritatea epiteliului de suprafata si o infiltratie limfoida difuza in lamina propria. Col HE x400;	102

77.	Figura 5.18. Cecum LE2. Epiteliul de suprafață este desprins în lamina propria infiltrate limfoide difuze;.....	102
78.	Figura 5.19. Cecum LE3. Epiteliul de suprafață este desprins în epiteliul glandular se observa numeroase limfocite intraepiteliale. Colorație HEx 400;.....	103
79.	Figura 5.20. Cecum LE4-Colorație HEx 100. Epiteliul de suprafață este desprins în lamina propria se observă un infiltrat limfoid redus periglandular. Colorație HEx 100;.....	103
80.	Figura 5.21. Înălțimea vilozităților duodenale;.....	104
81.	Figura 5.22. Înălțimea vilozităților cecale;.....	104
82.	Figura 5.23. Înălțimea vilozităților ileale;.....	105
83.	Figura 5.24. Înălțimea vilozităților jejunale;.....	105
84.	Figura 5.25. Grosimea musculoasei la nivelul duodenului;.....	105
85.	Figura 5.26. Grosimea musculoasei la nivelul jejunului;.....	105
86.	Figura 5.27. Grosimea musculoasei la nivelul ileonului;.....	105
87.	Figura 5.28. Grosimea musculoasei la nivelul cecumului;.....	105
88.	Figura 5.29. Diametrul vilozităților la nivelul cecumului;.....	106
89.	Figura 5.30. Diametrul vilozităților ileonului;.....	106
90.	Figura 5.31. Diametrul vilozităților duodenale;.....	106
91.	Figura 5.32. Diametrul vilozităților la nivelul jejunului;.....	106
92.	Figura 5.33. Se observă expresia lui p65 intracitoplasmatică intensă la lotul control a celulelor din lamina propria. Col IHC anti p65x100;.....	109
93.	Figura 5.34. Se observă expresia lui p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden la lotul E1. Col IHC anti IL-6 x400;.....	109
94.	Figura 5.35. La lotul E2 se observă expresia p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti p65 x400;.....	110
95.	Figura 5.36. Se observă la LE3 expresia lui p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti p65 x400;.....	110
96.	Figura 5.37. Se observă expresia lui p65 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti p65 x400;.....	110
97.	Figura 5.38. La lotul control Nrf2 se observă o expresie redusă a celulelor epiteliale și din lamina propria. Col anti Nrf2x400;.....	110
98.	Figura 5.39. La LE2 se observă expresia Nrf2 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti Nrf2 x400;.....	110
99.	Figura 5.40. La LE4 Se observa expresia Nrf2 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti Nrf2x400;.....	110
100.	Figura 5.41. Se observă expresia Nrf2 intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti Nrf2 x400;.....	110
101.	Figura 5.42. Expresia IL6 la lotul control. Se observă supraexpresia IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100;.....	112
102.	Figura 5.43. Expresia IL6 la LE1. Se observa expresia redusă a IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100;.....	113
103.	Figura 5.44. Expresia IL6 la lotul E2. Se observa expresia IL6 intracitoplasmatică a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti IL-6 x100;.....	113
104.	Figura 5.45. Se observa expresia IL6 intracitoplasmatică moderată în celulelor epiteliale din duoden la LE3. Col IHC anti IL-6 x100;.....	113
105.	Figura 5.46. Expresia IL6 la lotul E4. Se observa expresia IL6 intracitoplasmatică moderată spre intense la LE4. La baza epitelului se observa și prezenta unui edem. Col IHC anti -IL6.....	113
106.	Figura 5.47. Expresia TNFAP18 la lotul control. Se observa expresia intensă; intracitoplasmatică moderată-intensă în celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100;.....	113

107.	Figura 5.48. Expresia TNFAP18 la LE1. Se observă expresia intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100;.....	113
108.	Figura 5.49. Expresia TNFAP18 la LE2. Se observa expresia intracitoplasmatică moderată a celulelor epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100;.....	114
109.	Figura 5.50. Expresia TNF alfa la lotul E3. Se observa expresia IL6 intracitoplasmatică moderată în celulele epiteliale și un edem la polul bazal al epiteliului. Col IHC anti TNFAP18 x100;.....	113
110.	Figura 5.51. Expresia TNFAP18 la LE4. Se observa expresia intracitoplasmatică moderată spre intensă în celulele epiteliale din duoden. Col IHC anti TNFAP18 x100;.....	113
111.	Figura 5.52. Placile Payer din jejun la pasările din lotul control prezintă aglomerări limfoepiteliale difuze, moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a păstrat parțial integritatea. Col HE x40;.....	114
112.	Figura 5.53. Placile Payer din jejun la LE1 prezintă aglomerări limfoepiteliale moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a păstrat integritatea. Col HE x40;	114
113.	Figura 5.54. Placile Payer din jejun la LE2 prezintă aglomerări limfoepiteliale moderate, limfonoduli rari și epiteliul luminal care și-a pierdut parțial integritatea. Col HEx100;.....	114
114.	Figura 5.55. Placa Payer de la pasările din LE3. Se observa aglomerări limfoepiteliale mari, limfonoduli rari și epiteliul luminal desprins. Col Hex40;.....	114
115.	Figura 5.56. Placa Payer de la pasările din LE4. Se observa aglomerări limfoepiteliale mari, limfonoduli rari și edem la nivelul laminei proprii din zona luminală. Col HE x40;	115
116.	Figura 5.57. Amigdale cecale de la lotul control. Amigdalele cecale de la lotul control prezintă aglomerări limfoepiteliale, edem care determină desprinderea epiteliului de suprafață. Col HE x100;	115
117.	Figura 5.58. Amigdale cecale de la LE1. Amigdale cecale de la LE1 sunt formate din aglomerări limfoepiteliale în care se remarcă și limfonoduli. Col HE x100;	115
118.	Figura 5.59. Amigdale cecale la LE2, Amigdale cecale la LE2. La acest lot se evidențiază aglomerări limfoepiteliale și limfonoduli mici și rari. Col Hex100;	115
119.	Figura 5.60. Amigdalelor cecale la pasările din LE3. În lamina proprie a amigdalelor cecale la pasările din LE3 remarcăm țesut limfoid difuz asociat cu limfonoduli. Col HEx100;	115
120.	Figura 5.61. Amigdalele cecale la pasările din LE4. În lamina proprie a amigdalelor cecale la pasările din LE3 remarcăm țesut limfoid difuz asociat cu limfonoduli. Col Hex100.	115

Appendix 1. List of figures

1.	Figure 1.1. Chick in first week of life-LE1;.....	59
2.	Figure 1.2. Day-old chick-LE2;.....	59
3.	Figure 1.3. Base diet+20g turmeric to be homogenized ;.....	59
4.	Figure 1.4. Chicken -14 days-LE1;.....	59
5.	Figure 1.5. Chicken- 22 days-LE3;.....	59
6.	Figure 2.1. Duodenum of the Control batch chicks. The intestinal villi are thin with oedema and epithelial detachment in the apex area -HEA staining x40;	65
7.	Figure 2.2. Duodenum prices in the control group Duodenum prices in the control group. The luminal pole of the intestinal villi is very difficult to distinguish due to their detachment and the luminal content with which they intertwine. HE stain x40.....	65
8.	Figure 2.3. Duodenum from the Control Lot. In the axis of the intestinal villi and periglandular infiltrate with lymphocytes, oedema, and sometimes rupture of the epithelial barium are observed. -HEA stain x400	65
9.	Figure 2.4. Visible intestinal villi, more intact than in the control group. Some detachment can be seen in the luminal pole HEA staining x100.....	66
10.	Figure. 2.5. Villi covered by columnar epithelium consisting of enterocytes and frequent goblet cells. HEA staining	66
11.	Figure 2.6. Duodenum LE1 Inner circular, thickened and outer longitudinal layers of the muscularis.muscularis.-HEA staining x400.....	66
12.	Figure 2.7. Duoden LE2. Intestinal villi are long, small diameter, columnar epithelium preserving its integrity, crypt depth is reduced, muscular tunic is thin compared to control -HEAx100 staining	67
13.	Figure 2.8. In the axis of the intestinal villi at E2, duodenum, reduced lymphocytic infiltrate in the lamina propria and some intraepithelial lymphocytes were observed. HE stain x400	67
14.	Figure 2.9. Duoden LE2. Tunică musculară cu un strat circular intern ușor mai subțire în comparație cu lotul de control.HEA Stain x400	67
15.	Figure 2.10. Duodenum LE3-The intestinal cavities are long, varying in diameter, columnar epithelium partially retaining its integrity, crypt depth is reduced, muscular tunic is thin compared to control. HEA staining.....	67
16.	Figure 2.11. Duodenum LE3-The intestinal villi are long, varying in diameter, columnar epithelium partially intact, crypt depth is reduced, muscular tunic is thin compared to control. HEA staining	68
17.	Figure 2.12. Duoden LE3. . Muscle layer with obvious inner circular layer.-HEAx100 staining	68
18.	Figure 2.13. Duodenal villi height	69
19.	Figure 2.14. Duodenal villi diameter	69
20.	Figure 2.15. Crypt depths	69
21.	Figure 2.16. Effects of curcumin on the intestine.....	69
22.	Figure 3.1. IL-6 expression in the duodenal mucosa of the control group is evident both in the epithelium and in the lamina propria cell clusters. Col IHC anti-IL-6 x100.....	73
23.	Figure 3.2. TNFAIP8 expression in the control group appears moderate to intense, intracytoplasmic, both in the epithelium and in the lamina propria	73
24.	Figure 3.3. Pax 7 at the Control Lot. Note the intracytoplasmic expression from both epithelial cells and lamina propria. Col IHC anti Pax 7.....	73
25.	Figure 3.4. Moderate to reduced IL-6 expression in the duodenal epithelium of LE1 chicks. Col IHC anti IL-6 x100	73
26.	Figure 3.5. TNFAIP8 expression in the duodenum of -LE1 pups is moderate, especially in the columnar epithelium. Col IHC anti TNFAIP8x100	73

27.	Figure 3.6. Pax 7 expression in the duodenal epithelium from -LE1 is moderate, cytoplasmic. Col anti -Pax7 x100.....	74
28.	Figure 3.7. IL-6 expression is very low in the intestinal villi epithelium of LE2	74
29.	Figure 3.8. TNFAIP8 expression is evident intracytoplasmically and epithelial integrity is preserved in the duodenum of chickens from - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100.	74
30.	Figure 3.9. Pax 7 expression remains evident in the duodenum of LE2 chickens. The diameter of the villi is reduced and the integrity of the epithelial barrier is observed. Col anti Pax7x100.....	74
31.	Figure 3.10. IL-6 expression in the duodenum of LE3 chickens is moderate, more intense appearing towards the top of the intestinal villi which subsequently detach. Col IHC anti_IL-6 x100.....	74
32.	Figure 3.11. TNFAIP8 expression is evident intracytoplasmically and epithelial integrity is preserved in the duodenum of chickens from - LE2 Col IHC anti TNFAIP8 x100.	75
33.	Figure 3.12. Pax 7 expression remains evident in the duodenum of LE2 chickens. The diameter of the villi is reduced and the integrity of the epithelial barrier is observed. Col anti Pax7x100.....	75
34.	Figure 3.13. Intense expression of p65 in the cecum mucosa of chickens from the control group. Col IHCanti p65 x400	77
35.	Figure 3.14. Reduced expression of Nrf 2 in cecum mucosa in control chickens.....	77
36.	Figure 3.15. Moderate intense expression of p65 in the cecum mucosa of chickens from exp Lot 1. Col IHC anti p65 x400.....	77
37.	Figure 3.16. Moderate expression of p65 in the cecum mucosa of chickens from exp Lot 1. Col IHC anti p65 x400.....	77
38.	Figure 3.17. Moderate expression of Nrf2 in the cecum lining of chickens from exp Lot 1. Col IHC anti Nrf2x400.....	77
39.	Figure 3.18. Moderate intracytoplasmic expression of p65 in the cecum lining of LE 1 chickens. Col anti p65x400	77
40.	Figure 3.19. Reduced expression of p65 in the mucosa of the cecum of chickens from batch E2. p65	78
41.	Figure 3.20. Intense expression of Nrf2 in the cecum mucosa of chickens from exp batch 2. Col IHC anti Nrf2x400.....	78
42.	Figure 3.21. Moderate expression of Nrf2 in the cecum mucosa of chickens in Batch exp 3. Col IHC anti Nrf2x400.....	78
43.	Figure 4.1. J Figure 54. Figure Jejunum of chickens from the control group. Lower intestinal villi with lymphoepithelial clusters in lamina propria and intraepithelial. Towards the luminal pole, detachment of columnar epithelium is noted. HE stain x100.....	82
44.	Figure 4.2. Jejunum, Payer plate, in batch E1 shows lower villi and in the lamina propria diffuse lymphoepithelial clusters with rare lymph nodes. HEx100 stain	82
45.	Figure 4.3. Jejunum, Peyr's plaque at LE2 in which lymphoepithelial clusters and lymph nodes appear. HE x100 stain.	82
46.	Figure 4.4. Jejun came from LE3. Lymphoid agglomerations in the lamina propria, disruption of the epithelial barrier at the luminal pole of the mucosa. HE x40 staining	82
47.	Figure 4.5. Caecal tonsils from the control group. Lymphoepithelial agglomerations and moderate-sized lymph nodes are evident. Intestinal villi show occasional oedema and detached columnar epithelium Col HE x40.	83
48.	Figure 4.6. Fi.Cecal tonsil at LE1. Lymphoepithelial clusters and moderate-sized lymph nodes are evident. Intestinal villi show detached columnar epithelium in places HE x40 stain.	83
49.	Figure 4.7. Cecal tonsil from LE2 chicks. Lymphoepithelial clusters in which small lymph nodes are evident. The epithelial barrier at the luminal pole is intact. HE x40 staining.	83
50.	Figure 4.8. Cecal tonsils from LE3 chicks. Lymphoepithelial clusters are present in both the lamina propria and submucosa, and small lymph nodes are observed within them. Intestinal villi are lower with intact epithelial barrier. HE x40 staining.	83
51.	Figure 4.9. Weight gain (1-14 days)	87

52.	Figure 4.10. Weight gain (14-28 days)	87
53.	Figure 4.11. Weight gain (28-42 days)	87
54.	Figure 4.12. Weight gain (1-42 days)	87
55.	Figure 4.13. Feed consumption/chicken 1-7 days	92
56.	Figure 4.14. Feed consumption/chicken 8-14 days	92
57.	Figure 4.15. Feed consumption/chicken 15-21 days	92
58.	Figure 4.16. Feed consumption 22-28 days	92
59.	Figure 4.17. Feed consumption 29-42 days	93
60.	Figure 5.1. Duodenum LC – Duodenum Lot Control The villi are long with a foliated appearance and a diffuse lymphoid infiltrate is seen in the axis of the villi -HEAx40 staining.....	101
61.	Figure 5.2. LE1 Duodenum with long villi, larger diameter towards the base and reduced towards the luminal pole. The columnar epithelium is detached in the luminal area of the tip of the villi. Col HE x40	101
62.	Figure 5.3. Duodenum LE2. Long villi with a narrow diameter and reduced lymphoid infiltrates in their axis HE x40 staining	101
63.	Figure 5.4. Duodenum LE3 Col HE x40.	101
64.	Figure 5.5. Duodenum LE4 Col HE x100	101
65.	Figure 5.6. Jejun Lot Control. Long villi with diffuse lymphoid infiltrates in the axis of the villi and periglandular stainingHEA x40.....	101
66.	Figure 5.7. The jejunal mucosa of LE1 Col HE x40	101
67.	Figure 5.8. The jejunal mucosa of LE2 shows lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa in both the cay and periglandular villous axis. The luminal pole villi have detached columnar epithelium. Col HE x100	101
68.	Figure 5.9. The mucosa of the jejunum of LE3 shows lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa both in the axis of the villus and large periglandular clumps. Villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. Col HE x100.	101
69.	Figure 5.10. Jejunum LE4 – Villi with luminal pole showing detached epithelium, reduced lymphoid infiltration in the axis of the villi and periglandular HE x100 staining	102
70.	Figure 5.11. The ileum mucosa of the control group shows reduced lymphoid infiltration in the lamina propria of the mucosa in both the villous and periglandular axis. The villi at the luminal pole have a small diameter. HE x100 staining.....	102
71.	Figure 5.12. The mucosa of the ileum of LE1 shows reduced lymphoid infiltrates, diffusely arranged in the lamina propria of the mucosa both in the axis of the villus. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. Col Hex100	102
72.	Figure 5.13. The mucosa of the ileum of LE2 shows large lymphoid infiltrates in the lamina propria of the mucosa and periglandular. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. Col Hex100.....	102
73.	Figure 5.14. The ileum mucosa of LE3 shows large lymphoid infiltrates in the lamina propria of the periglandular mucosa. The villi at the luminal pole have detached columnar epithelium. HE x100..	102
74.	Figure 5.15. Ileal mucosa of LE4 villi of the luminal pole with detached columnar epithelium. HE x100 staining	102
75.	Figure 5.16. CECUM Lot C- The surface epithelium is detached and the glandular epithelium shows intraepithelial lymphocytes Hex400 staining	102
76.	Figure 5.17. Cecum came from LE1. There is evidence of surface epithelial integrity and diffuse lymphoid infiltration in the lamina propria. HE x400 staining	102
77.	Figure 5.18. Cecum LE2. Surface epithelium is detached In lamina propria diffuse lymphoid infiltrates. HE x 400 staining.....	102
78.	Figure 5.19. Cecum LE3. The surface epithelium is detached In the glandular epithelium numerous intraepithelial lymphocytes are observed. HE x 400 staining	103

79.	Figure 5.20. Cecum LE4. The surface epithelium is split In the lamina propria a reduced periglandular lymphoid infiltrate is observed. HEx 100 staining.....	103
80.	Figure 5.21. Duodenal villi height.....	104
81.	Figure 5.22. Cecal villi height.....	104
82.	Figure 5.23. Ileal villi height.....	105
83.	Figure 5.24. Jejunal villi height.....	105
84.	Figure 5.25. Muscle thickness of the duodenum.....	105
85.	Figure 5.26. Muscle thickness at the jejunum.....	105
86.	Figure 5.27. Musckle thickness of the ileum.....	105
87.	Figure 5.28. Musckle thickness of the cecum.....	105
88.	Figure 5.29. Cecum villi height.....	106
89.	Figure 5.30. Ileal villi diameter.....	106
90.	Figure 5.31. Duodenal villi diameter.....	106
91.	Figure 5.32. Jejunal villi height.....	106
92.	Figure 5.33. The expression of intense intracytoplasmic p65 is observed in the control group of lamina propria cells. Col IHC anti p65x100.....	109
93.	Figure 5.34. Moderate intracytoplasmic p65 expression of duodenal epithelial cells in batch E1 is observed. Col IHC anti p-65 x400.....	109
94.	Figure 5.35. Moderate intracytoplasmic p65 expression in duodenal epithelial cells is observed in batch E2. Col IHC anti p65 x400.....	110
95.	Figure 5.36. Moderate intracytoplasmic p65 expression of duodenal epithelial cells is observed in LE3. Col IHC anti p65 x400.....	110
96.	Figure 5.37. Moderate intracytoplasmic p65 expression is observed in duodenal epithelial acellulas. Col IHC anti p65 x400.....	110
97.	Figure 5.38. Reduced expression of epithelial and lamina propria cells is observed in the Nrf2 control group. Col anti Nrf2x400.....	110
98.	Figure 5.39. Moderate intracytoplasmic Nrf2 expression in duodenal epithelial cells is observed in LE2. Col IHC anti Nrf2 x400.....	110
99.	Figure 5.40. In LE4 Intracytoplasmic Nrf2 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti Nrf2 x400.....	110
100.	Figure 5.41. Moderate intracytoplasmic Nrf2 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti Nrf2 x400.....	110
101.	Figure 5.42. IL6 expression in control group. Intracytoplasmic IL6 overexpression of duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti IL-6 x100.....	112
102.	Figure 5.43. IL6 expression in LE1. Reduced intracytoplasmic IL6 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti IL-6 x100.....	113
103.	Figure 5.44. IL6 expression in batch E2. Intracytoplasmic IL6 expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti IL-6 x100.....	113
104.	Figure 5.45. Moderate intracytoplasmic IL6 expression is observed in duodenal epithelial cells of the LE3. Col IHC anti IL-6 x100.....	113
105.	Figure 5.46. IL6 expression in batch E4. Moderate to intense intracytoplasmic IL6 expression is observed in LE4. At the base of the epithelium, edema is also present. Col IHC anti -IL6.	113
106.	Figure 5.47. TNFAP18 expression in the control group. Intense, moderate-intense intracytoplasmic expression in duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti TNFAP18 x100.....	113
107.	Figure 5.48. Reduced intracytoplasmic expression of duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti TNFAP18 x100.....	113
108.	Figure 5.49. TNFAP18 expression in LE2. moderate intracytoplasmic expression of duodenal epithelial cells is observed. Col IHC anti TNFAP18 x100.....	114
109.	Figure 5.50. TNF alpha expression in the E3 group. Moderate intracytoplasmic IL6 expression is seen in epithelial cells and edema at the basal pole of the epithelium. Col IHC anti TNFAP18x100 ..	114

110.	Figure 5.51. TNFAPI8 expression in LE4. Moderate to intense intracytoplasmic ra expression is observed in duodenal epithelial cells. Col IHC anti TNFAPI8 x100	114
111.	Figure 5.52. Payer plaques in the jejunum of the control birds showed diffuse, moderate lymphoepithelial clumping, sparse lymph nodes and luminal epithelium that partially preserved its integrity. Col HE x40.....	114
112.	Figure 5.53. Payer's plaques in the jejunum of LE1 show moderate lymphoepithelial clusters, sparse lymph nodes and luminal epithelium that has preserved its integrity. Col HE x40.	114
113.	Figure 3.54. Payer's plaques in the jejunum in LE2 show moderate lymphoepithelial clusters, sparse lymph nodes and luminal epithelium that has partially lost its integrity. Col HE x100	114
114.	Figure 5.55. Payer plate from LE3 birds. Large lymphoepithelial clusters, sparse lymph nodes and detached luminal epithelium are observed. Hex40 col.	114
115.	Figure 5.56. Payer plate from LE4 birds. Large lymphoepithelial clusters, rare lymph nodes and oedema of the lamina propria in the luminal area are observed. Col HE x40.	115
116.	Figure 5.57. Cecal tonsils from the control group. Cecal tonsils from control group show lymphoepithelial clumping, oedema causing detachment of surface epithelium. Col HE x100.....	115
117.	Figure 5.58. Cecal tonsil of LE1. The cecal tonsils of LE1 consist of lymphoepithelial clusters in which lymph nodes are also noted. Col HE x100.	115
118.	Figure 5.59. Cecal tonsil at LE2, Cecal tonsil at LE2. Small and rare lymphoepithelial clusters and lymph nodes are evident in this lot. HEx100 staining.....	115
119.	Figure 5.60. Cecal tonsils in LE3 birds. In the lamina propria of the cecal tonsils of LE3 birds we note diffuse lymphoid tissue associated with lymph nodes. HEx100 staining	115
120.	Figure 5.61. Caecal tonsils from the LE4. Cecal tonsils in LE4 birds. In the lamina propria of the cecal tonsils in LE3 birds we note diffuse lymphoid tissue associated with lymph nodes.HE x100 staining.	115

Anexa 2. Listă tabele

1.	Tabel 1. Dieta starter;	60
2.	Tabel 2. Dieta de creștere;	60
3.	Tabel 3. Dieta de finisare;	61
4.	Tabel 4. Efectele adaosului de turmeric la diferite niveluri (Curcuma longa) în dieta puilor broiler asupra structurii histologice duodenale (mean ± standard error);	68
5.	Tabel 5. Analiza de regresie între nivelurile de adaos de curcuma (Curcuma longa) în dieta puilor de carne și parametrii privind histologia duodenală;	70
6.	Tabel 6. Greutatea puilor în perioada experimentală;	87
7.	Tabel 7. Consumul de hrană al puilor;	91
8.	Tabel 8. Indicele de conversie al hranei la puii broiler expuși la curcuma;	92
9.	Tabel 9. FCR lot control;	93
10.	Tabel 10. FCR LE1;	93
11.	Tabel 11. FCR LE2;	93
12.	Tabel 12. FCR LE3;	94
13.	Tabel 13. Protocolul de administrare a ZBR2;	100
14.	Tabel 14. Dietă găini ouătoare- Furaj Nutrisoya;	101
15.	Tabel 15. Valorile morfometrice ale mucoasei intestinale în timpul experimentului (μm); ..	104

Appendix 2. List of tables

1.	Table 1. Starter diet;	60
2.	Table 2. Growth diet;	60
3.	Table 3. Finishing diet;	61
4.	Table 4. Effects of turmeric (<i>Curcuma longa</i>) addition at different levels in broiler chick diet on duodenal histological;	68
5.	Table 5. Regression analysis between levels of added turmeric (<i>Curcuma longa</i>) in broiler diets and duodenal histology parameters;	70
6.	Table 6. Chicken weight during the experimental period;	87
7.	Table 7. Feed consumption of chicks;	91
8.	Table 8. Feed conversion index of broiler chickens exposed to turmeric;	92
9.	Table 9. FCR batch control;	93
10.	Table 10. FCR LE1;	93
11.	Table 11. FCR LE2;	93
12.	Table 12. FCR LE3;	94
13.	Table 13. ZBR2 management protocol;	100
14.	Table 14. Laying hens diet - Nutrisoya feed;	101
15.	Table 15. Morphometric values of intestinal mucosa during the experiment (μm);	104

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

LIST OF PUBLICATIONS

În reviste ISI

Prim autor

1. Bondar, A., Macari, V., Rudic, V., Pistol, G., Putin, V., Rotaru, A., ...Solcan G. & Solcan, C. (2022). Effects of ZooBioR2 product as feed supplement in laying hens on the morphofunctional state of intestinal mucosa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 74, 626-632., DOI 10.1590/1678-4162-12592, IF 0,409
2. Adrian Bondar, Bogdan Gabriel Șlencu, Ivona Popovici, Carmen Solcan, „Effect of turmeric (*curcuma longa*) on the duodenal structure in broiler chickens”. *Brazilian Journal of Poultry Science*, vol 25, issue 3/ 2023, ISSN 1516-635X, IF 1.1
3. Adrian Bondar, Loredana Horodincu, Gheorghe Solcan, Carmen Solcan. , Use of curcumin and *Spirulina platensis* as nutraceuticals in poultry. *Agriculture*, (MDPI), E-ISSN 2077-0472, **2023**, 13, manuscript nr. agriculture-2410769, IF 3,6.

În volume BDI

1. Bondar, Adrian, V. Macari, V. Rudic, Ghe. Pistol, V. Putin, Ana Rotaru, Tatiana Chiriac, Carmen Solcan. "Efectele extractului de spirulina platensis (ZooBior2) asupra mucoasei intestinale la găinile ouătoare." *Romanian Journal of Veterinary Medicine and Pharmacology*, Vol. VIII, 39(1):18-25. ISSN 2537-4095.
2. Bondar, Adrian, and Carmen Solcan. "Utilizarea curcuminei ca nutraceutic la păsări. *Romanian Journal of Veterinary Medicine and Pharmacology*, Vol. VIII, 39(1):58-65. ISSN 2537-4095..

Conferințe naționale/internaționale

Participare Conferință internațională *Higher education for sustainable Development of a Smart Region*, 16 Mai 2023 Siaulių Kolegijacu, Lituania -, „The effects of the use of phytogenic additives on the health of farmed animals and ultimately consumers. Authors: A. Bondar, C. Solcan, D. Cojocariu.

Drd. Adrian Bondar