

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIEȚII
„ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ 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,
Andrei -Claudiu PROCA**

**IAȘI
2024**

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ 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,
Andrei -Claudiu PROCA**

**IAȘI
2024**

IAȘI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: NORMAL AND PATHOLOGICAL MORPHOLOGY

DOCTORAL THESIS

PhD Coordinator,
Prof. PhD. Carmen SOLCAN

PhD Student,
Andrei -Claudiu PROCA

IAȘI
2024

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: MORFOLOGIE NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ**

**CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL UNOR
ANTIOXIDANȚI NATURALI ASUPRA TUBULUI
DIGESTIV LA PORCII CRESCUȚI ÎN SISTEM
INTENSIV**

**Conducător de doctorat,
Prof. Univ. Dr. Carmen SOLCAN**

**Doctorand,
Andrei -Claudiu PROCA**

**IAȘI
2024**

**IAȘI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: NORMAL AND PATHOLOGICAL MORPHOLOGY**

**RESEARCH ON THE EFFECT OF NATURAL
ANTIOXIDANTS ON THE DIGESTIVE TRACT
IN INTENSIVELY REARED PIGS**

**PhD Coordinator,
Prof. PhD. Carmen SOLCAN**

**PhD Student,
Andrei -Claudiu PROCA**

**IAȘI
2024**

CUPRINS

INTRODUCERE.....	5
REZUMAT	8
PARTEA I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	18
1. MORFOFIZIOLOGIA TUBULUI DIGESTIV LA PORC.....	20
1.1. Particularități histologice ale cavității bucale și ale glandelor salivare la porc	20
1.1.1. Cavitătea bucală	20
1.1.2. Glandele salivare	21
1.2. Particularități histologice ale stomacului la porc.....	24
1.3. Particularități histologice ale tractului intestinal la porc.....	28
1.3.1. Intestinul subțire.....	28
1.3.2. Intestinul gros.....	33
2. SISTEMUL IMUNITAR INTESTINAL LA PORC	36
2.1. Țesutul limfoid asociat intestinului (GALT).....	36
2.1.1. Plăcile Peyer.....	36
2.1.2. Complexe limfo-glandulare.....	38
2.1.3. Limfoepiteliul.....	38
2.1.4. Ganglioni limfatici mezenterici	39
2.2. Răspunsul imunitar al mucoasei digestive.....	40
2.2.1. Sistemul imunitar rezident	40
2.2.2. Sistemul imunitar înăscut	43
2.2.3. Sistemul imunitar adaptativ.....	45
3. UTILIZAREA POLIFENOLILOR DIN STRUGURI CA ANTIOXIDANȚI NATURALI ÎN HRANA PORCILOR	48
3.1. Producția de struguri	48
3.2. Subprodusele din struguri ce pot fi introduse în hrana animalelor	49
3.3. Structura chimică a polifenolilor din struguri	51
3.4. Biodisponibilitatea polifenolilor la nivele intestinal	56
3.5. Bioefectele polifenolilor în producția porcină.....	57
PARTEA II CERCETĂRI PROPRII.....	61
4. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI.....	63
5. CADRUL ORGANIZATORIC ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE	64
6. CERCETĂRI PRIVIND PARTICULARITĂȚI MORFOSTRUCTURALE ȘI FUNCTIONALE ALE INTESTINULUI SUBȚIRE LA PORCII DIN RASA PIETRAIN	66
6. 1. Material și metodă.....	66
6. 2. Rezultate.....	67
6. 3. Discuții	73
6. 4. Concluzii parțiale	78
7. ANALIZA HISTOLOGICĂ PRIVIND REACTIVITATEA MUCOASEI INTESTINALE ÎN URMA INTRODUCERII ÎN HRANĂ A TESCOVINEI DE STRUGURI LA PORCII DIN RASA PIETRAIN	79
7. 1. Material și metodă.....	79
7. 2. Rezultate.....	800
7. 3. Discuții	106
7. 4. Concluzii parțiale	110

8. EXPRESIA IMUNOHISTOCHIMICĂ A MARKERILOR PRO-INFLAMATORI (IL-1 β , TNF- α ȘI MCH-II) ȘI REDOX (NRF2 ȘI P65) LA NIVELUL INTESTINULUI PENTRU PORCII HRĂNIȚI CU TESCOVINĂ DE STRUGURI NEGRI	111
8. 1. Material și metodă.....	111
8.2. Rezultate.....	112
8.3. Discuții	134
8.4. Concluzii parțiale	142
9. CERCETĂRI PRIVIND EVOLUȚIA PARAMETRILOR PERFORMANȚEI DE CREȘTERE A PORCILOR HRĂNIȚI CU O DIETĂ SUPLIMENTATĂ CU TESCOVINĂ DE STRUGURI NEGRI.....	143
9.1. Material și metodă.....	143
9.2. Rezultate.....	143
9.3. Discuții	145
9.4. Concluzii parțiale	148
CONCLUZII GENERALE	149
BIBLIOGRAFIE	155
ANEXA 1. LISTA ABREVIERILOR	177
ANEXA 2. LISTA FIGURILOR.....	179
ANEXA 3. LISTA TABELELOR.....	188
ANEXA 4. LISTA PUBLICAȚIILOR	189

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION.....	7
ABSTRACT	13
PART I	18
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	18
1. MORPHOPHYSIOLOGY OF THE DIGESTIVE TRACT IN PIGS.....	20
1.1. Histologic features of the oral cavity and salivary glands in pigs	20
1.1.1. Oral cavity.....	20
1.1.2. Salivary glands	21
1.2. Histologic features of the pig stomach	24
1.3. Histologic features of the intestinal tract in pigs	28
1.3.1. Small intestine.....	28
1.3.2. Large intestine.....	33
2. INTESTINAL IMMUNE SYSTEM IN PIGS.....	36
2.1. Gut-associated lymphoid tissue (GALT).....	36
2.1.1. Peyer Plates.....	36
2.1.2. Lympho-glandular complexes	38
2.1.3. Lymphoepithelium.....	38
2.1.4. Mesenteric lymph nodes	39
2.2. Digestive mucosal immune response	40
2.2.1. Resident immune system.....	40
2.2.2. Innate immune system	43
2.2.3. Adaptive immune system.....	45
3. USE OF GRAPE POLYPHENOLS AS NATURAL ANTIOXIDANTS IN PIG DIETS	48
3.1. Grape production	48
3.2. Grape by-products that can be fed to animals	49
3.3. Structura chimică a polifenolilor din struguri	51
3.4. Bioavailability of polyphenols at intestinal levels.....	56
3.5. Bioeffects of polyphenols in pig production	57
PART II	61
PERSONAL CONTRIBUTION	61
4. PHD THESIS AIM AND OBJECTIVES	63
5. THE ORGANIZATIONAL STRUCTURE IN WHICH THE RESEARCH WAS CARRIED OUT	64
6. RESEARCH ON MORPHOSTRUCTURAL AND FUNCTIONAL PARTICULARITIES OF THE SMALL INTESTINE IN PIETRAIN PIGS.....	66
6. 1. Material and method.....	66
6. 2. Results	67
6. 3. Discussion.....	73
6. 4. Partial conclusions	78
7. HISTOLOGIC ANALYSIS OF THE REACTIVITY OF THE INTESTINAL MUCOSA FOLLOWING THE INTRODUCTION OF GRAPE TESCOVINE IN PIETRAIN PIGS	79
7. 1. Material and method.....	79

7. 2. Results	800
7. 3. Discussion.....	106
7. 4. Partial conclusions.....	110
8. IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY (IL-1 β , TNF- α AND MCH-II) AND REDOX (NRF2 AND P65) MARKERS IN THE INTESTINES OF BLACK STRIP TESCOVIN-ROASTED SWINE	111
8. 1. Material and method.....	111
8.2. Results	112
8.3. Discussion.....	134
8.4. Partial conclusions.....	142
9. CERCETĂRI PRIVIND EVOLUȚIA PARAMETRILOR PERFORMANȚEI DE CREȘTERE A PORCILOR HRĂNIȚI CU O DIETĂ SUPLIMENTATĂ CU TESCOVINĂ DE STRUGURI NEGRI.....	143
STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF GROWTH PERFORMANCE PARAMETERS IN PIGS FED A DIET SUPPLEMENTED WITH BLACK GRAPE TESCOVIN	143
9.1. Material and method.....	143
9.2. Results	143
9.3. Discussion.....	145
9.4. Partial conclusions.....	148
GENERAL CONCLUSIONS	152
REFERENCES.....	155
ANNEX 1. LIST OF ABBREVIATIONS	177
ANNEX 2. LIST OF FIGURES	179
ANNEX 3. LIST OF TABLES	188
ANNEX 4. LIST OF PUBLICATIONS	189

INTRODUCERE

Creșterea cererii pentru carnea de porc este din ce în ce mai mare (Henchion și col., 2021), iar pentru a satisface această cerere, este esențial să se îmbunătățească eficiența producției de porcine (Cheng și col., 2021; Matarneh și col., 2021). Furajele reprezintă cea mai mare parte din costul total al producției de animale (Erinle și Adewole, 2022). Prin urmare, identificarea de alternative viabile din punct de vedere economic și durabil la furajele convenționale este de o importanță capitală. Subprodusele agroindustriale reprezintă o opțiune notabilă, deoarece acestea sunt generate anual în cantități mari, majoritatea fiind aruncate sau depozitate ca deșeuri (Erinle și Adewole, 2022),

Numeroase studii au arătat că reutilizarea subproduselor agricole poate nu numai să reducă costurile, dar și să îmbunătățească condițiile de mediu (Altmann și col., 2018; Reckmann și col., 2016). Aceste subproduse sunt abundente și necostisitoare și reprezintă surse abundente de constituenți nutriționali precum fibre, proteine, minerale, antioxidanți și vitamine. Datorită conținutului lor de componenți bioactivi, acestea sunt bine adaptate pentru a fi utilizate ca ingrediente suplimentare în dietele pentru porci (Spigno și col., 2017).

La animalele de fermă, efectele includerii în dietă a sub-produselor de struguri și capacitatea acestora de a modula răspunsuri fiziologice importante (de exemplu, inflamația, stresul oxidativ) prin compușii lor bioactivi au fost puțin investigate până în prezent (Gessner și col., 2013, Pascariu și col, 2017). Cu toate acestea, studiile efectuate până în prezent au evidențiat capacitatea polifenolilor din struguri de a acționa ca antioxidanți puternici împotriva peroxidării lipidelor, cu îmbunătățirea calității cărnii și a sănătății intestinale (Gessner și col., 2017, Proca și col, 2024).

Adăugarea unui extract de struguri sau a tescovinei de struguri fermentată în dieta porcilor pentru finisare a îmbunătățit performanța animalelor și a determinat o creștere a acizilor grași polinesaturați totali din grăsimea subcutanată, o oxidare scăzută a lipidelor și o stabilitate ridicată a culorii cărnii (Garrido și col., 2011; Yan și Kim, 2011). Cu toate acestea, efectele acestor compuși în ceea ce privește răspunsul lor antiinflamator și de apărare antioxidantă au fost mai puțin investigate la această categorie de animale de fermă.

Scopul pe termen lung al acestui studiu este de a dezvolta strategii dietetice prin intermediul subproduselor din struguri bogate în polifenoli cu rol antioxidant pentru hrana animalelor, care vor contribui asupra sănătății animalelor. Ipoteza centrală este că tescovina de struguri va îmbunătăți morfostructura intestinală și va modula răspunsul imun, astfel promovând starea de homeostazie a tubului digestiv (Mbimba și col., 2012; Pistol și col., 2014).

INTRODUCTION

Demand for pork is on the rise (Henchion et al., 2021) and improvements in pig production efficiency are essential to meet this demand (Cheng et al., 2021; Matarneh et al., 2021). Feed represents the major portion of total livestock production costs (Erinle and Adewole, 2022). Identifying economically viable and sustainable alternatives to traditional diets is therefore crucial. Agricultural by-products are a noteworthy option as they are accumulated annually in large quantities, mostly disposed of or land-filled (Erinle and Adewole, 2022).

Many studies have demonstrated that re-using agricultural by-products not only reduces costs but can also contribute to improving the environment (Altmann et al., 2018; Reckmann et al., 2016). Such by-products are available in abundance and at low cost, and are rich sources of nutritional components such as fibre, protein, minerals, antioxidants and vitamins. They are well suited for use as feed additives in pig diets due to their content of bioactive principles (Spigno et al., 2017).

In farm animals, there has been little research into the effects of including grape waste in the diet and its ability to modulate key physiological responses (e.g. inflammation, oxidative stress) through its bioactive compounds (Gessner et al., 2013; Pascariu și col, 2017). However, studies conducted so far revealed the ability of grape polyphenols to act as potent antioxidants against lipoperoxidation, improving meat quality and gut health (Gessner et al., 2017; Proca și col, 2024).

Adding grape extract or fermented grape pomace to the feed of finishing pigs enhanced animal performance and caused an elevation of total polyunsaturated fatty acids in subcutaneous fat, low lipoxidation and high meat colour stability (Garrido et al., 2011; Yan and Kim, 2011). However, the impact of grape compounds on anti-inflammatory and antioxidant defences has been less studied in this category of livestock.

The long term goal of this study is to develop dietary strategies using antioxidant polyphenol-rich grape by-products for animal feed that will contribute to animal health. The central hypothesis is that grape tescovin will improve gut intestinal morphostructure and modulate the immune response, thus promoting the homeostatic state of the gastrointestinal tract (Mbimba et al., 2012; Pistol et al., 2014).

REZUMAT

Teza de doctorat, având titlul "CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL UNOR ANTIOXIDANȚI NATURALI ASUPRA TUBULUI DIGESTIV LA PORCII CRESCUȚI ÎN SISTEM INTENSIV" a fost elaborată conform metodologiei de redactare a unei teze de doctorat, cuprinzând 2 părți: prima însumă stadiile actuale ale literaturii de specialitate din domeniul tezei, urmată de partea a doua, unde sunt relatate rezultatele obținute în urma cercetărilor proprii asupra temei abordate.

Prima parte a tezei este alcătuită din 3 capitole ce totalizează informații din morfofiziologia cavității bucale, a glandelor salivare, a stomacului și a tubul intestinal (subțire și gros) a porcului Pietrain; sistemul imunitar intestinal cu accent pus pe țesutul limfoid asociat mucoasei intestinale și utilizarea polifenolilor din struguri ca și antioxidanți în creșterea porcilor cu desrierea structurii lor chimice, a biodisponibilității și a bioefectelor la nivel intestinal.

A doua parte a tezei cuprinde 6 capitole care: expun scopul și obiectivele tezei; și rezultatele cercetărilor referitoare la: particularitățile histologice și fiziologice ale intestinului subțire, strict la porcii din rasa Pietrain și a răspunsului indus de tescovina de struguri negri adăugată în dietă asupra sănătății intestinale și a indicilor productivi la porci.

Toate cele descrise mai sus, sunt prezentate prin 51 de figuri originale și 10 tabele, fiind consultate 496 de referințe bibliografice.

Capitolul 4 se intitulează "**Scopul și obiectivele tezei**", evidențiind principalele obiective pentru realizarea tezei de doctorat:

- Evaluare histologică a intestinului subțire la porcii Pietrain, punându-se accentul pe analiza înălțimii vilozităților intestinale, a adâncimii criptelor Lieberkühn, a morfologiei epitelului columnar cu platou striat, a numărului de celule caliciforme, a populațiilor celulare infiltrate în lamina propria, a grosimii musculaturii mucoasei și a țesutului limfoid prezent în jejun și ileon;
- Urmărirea răspunsului mucoasei intestinale după provocarea cu polifenolii din tescovina de struguri introdusă în hrana porcilor, de-a lungul unei perioade experimentale de 3 luni. În acest studiu au fost calculate variațiile înălțimii vilozităților intestinale, a lungimii

glandelor Lieberkühn, a raportului înălțime vilozitate/ adâncime criptă și a dimensiunilor limfonodulilor ce alcătuiesc plăcile Peyer;

- Evidențierea prin tehnica imunohistochimică a reducerii unor markeri pro-inflamatori și promovarea celor responsabili de inducerea efectului antioxidant la nivel intestinal, ca urmare a introducerii tescovinei de struguri negri în dieta de bază a porcilor, timp de 3 luni;
- Calcularea unor indici care reflectă eficiența producției în cazul porcilor crescuți în sistem intensiv și hrăniți cu tescovină de struguri negri.

Capitolul 5 este intitulat "**Cadrul organizatoric în care s-au desfășurat cercetările**".

În cadrul acestui capitol este descris efectivul de porci utilizat în experimentele tezei, oferindu-se detalii despre rasă, vârstă și condițiile de creștere aplicate în fermă. De asemenea, este descrisă dieta cu tescovina de struguri negri din punct de vedere al conținutului total de fenoli și flavonoide, dar și a activității antioxidante.

Capitolul 6 este intitulat "**Cercetări privind particularități morfostructurale și functionale ale intestinului subțire la porcii din rasa Pietrain**" având scop principal scoaterea în evidență a deosebirilor fiziologice și histologice întâlnite la intestinul subțire, specifice porcilor Pietrain.

Porcii ($n=10$) au fost incluși în experiment la vârsta de 180 de zile și cu o greutate medie de $85,09 \pm 5,11$ kg. Hrana primită a fost un furaj complet pentru îngrășare, de tip granule, administrat ad libitum, pe o perioadă de 90 de zile. După încheierea perioadei experimentale, porcii au fost sacrificați într-un abator și prelevat intestinul subțire. Cercetarea a continuat apoi în laborator, unde au fost obținute preparatele histologice.

Mucoasa duodenului a avut o grosime medie de $960\mu\text{m}$, fiind alcătuită din vilozități intestinale ($250\mu\text{m}$), strat glandular în lamina propria ($420\mu\text{m}$) și *muscularis mucosae* ($25\mu\text{m}$). Epiteliul de la suprafață este unul columnar cu platou striat, fiind format din numeroase enterocite și celule caliciforme. Enterocitele variază din punct de vedere a dimensiunii, în funcție de poziția lor: în glandele Lieberkühn (locul de unde iau naștere) au formă cubică, crescând treptat spre o formă prismatică la baza vilozităților (cu înălțimea de $17\mu\text{m}$) și în vârful vilozităților (înălțimea de $30\mu\text{m}$). Înălțimea microvililor este mai mică la enterocitele de la baza vilozităților ($0,5\mu\text{m}$) și mai mare ($1,5\mu\text{m}$) pentru cele aflate în vârful vilozităților. Mușchiul Bruke se găsește la axul central al fiecărei vilozități și provine din fibrele musculare ale lui *muscularis mucosae*. Grosimea acestui mușchi poate ajunge până la $50\mu\text{m}$. Grosimea

submucoasei poate ajunge până la 500 μ m, aici găsim-se glandele Brünner mixte, care sunt alcătuite atât din unități secretoare seroase, cât și mucoase. Musculoasa este alcătuită din stratul intern cu fibrele musculare dispuse circular (200 μ m) și stratul extern cu fibrele orientate longitudinal (125 μ m). Între aceste straturi de mușchi se localizează plexul mienteric nervos vegetativ Auebach. Ultima tunică a duodenului este seroasa cu o grosime de până la 80 μ m.

În jejun au fost raportate cele mai mari valori pentru înălțimea totală a mucoasei (1006 μ m), pentru înălțimea vilozităților (246 μ m) și cea mai mare lungime a glandelor Lieberkühn (604 μ m). Vilozități înalte înseamnă o suprafață de absorbție mai mare, implicit și o digestie și o absorbție mai bună în jejun. Tot în jejun au fost observate mai multe celule caliciforme decât în duoden.

Cele mai importante structuri observate în submucoasa distală a jejunului, dar și în ileon sunt plăcile Peyer. Aceste formațiuni limfoide sunt mari atât în jejun (985 μ m), cât și în ileon (760 μ m) și imprimă submucoasei o grosime dublă față de cea întâlnită la duoden.

În cadrul ileonului au fost înregistrate cele mai mici valori pentru grosimea totală a mucoasei (454 μ m), pentru înălțimea vilozităților (125 μ m) și lungimea glandelor intestinale (347 μ m) și cea mai mare valoare pentru grosimea *muscularis mucosae* (80 μ m). Acest lucru explică faptul că principala funcție a ileonului nu este în digestie și absorbție, ci în apărarea imunitară prin țesutul limfoid asociat mucoasei, care este foarte dezvoltat.

Musculoasa ce aparține jejunului dar și a ileonului devine mai groasă pe măsură ce se aproprie de intestinul gros. Deși grosimea crește pentru ambele straturi de mușchi din musculoasă (circular și longitudinal), ele rămân proporțional egale.

Sistemul nervos enteric ia parte atât la modularea răspunsului imun intestinal cât și la digestie. Fibrele nervoase în urma impulsurilor venite de la neuronii adrenergici și colinergici, eliberează neuropeptide cu funcții modulatorie.

Porcii din rasa Pietrain au o performanță productivă mare datorită corelațiilor formate între morfoarhitectura tubul intestinal, mesajele neuro-endocrine dar și a țesutul limfoid rezident în intestinul subțire.

Capitolul 7 este intitulat "**Analiza histologică privind reactivitatea mucoasei intestinale în urma introducerii în hrană a tescovinei de struguri la porcii din rasa Pietrain**". În acest capitol, scopul principal a fost de a observa ce efecte provoacă includerea în hrana porcilor, a tescovinei de struguri negri asupra aspectului histologic al tubul digestiv.

Experimentul s-a desfășurat în sistem intensiv, porcii (n=50) având aceeași vârstă (180 zile) și aceeași greutate inițială ($85,09 \pm 5,11$ kg). Pentru a găsi doza optimă de tescovină pentru dieta porcilor care poate modifica morfologia mucoasei și a submucoasei intestinale, aceasta a fost administrată în doze diferite, timp de 3 luni. Totodată, a fost divizat și lotul total de animale în loturi experimentale mai mici în funcție de doza de tescovină, astfel obținându-se următorul protocol experimental: LM (10 porci cu dieta de bază), LE1 (10 porci cu adaos de 1g/kg tescovină), LE2 (10 porci cu adaos de 5g/kg tescovină), LE3 (10 porci cu adaos de 10g/kg tescovină) și LE4 (10 porci cu adaos de 15g/kg tescovină). Efectele tescovinei de-a lungul experimentului asupra intestinului subțire au fost reprezentate de schimbări semnificative ale structurii mucoasei cât și a țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale. La doza de 10g/kg, în duoden, au fost observate cele mai valori pentru înălțimea vilozităților intestinale, a adâncimii criptelor, dar și a raportului dintre ele. Cele mai mici valori pentru morfoarhitectura intestinală, au fost raportate la LE1, având valori aproximativ egale cu cele de la LM. Indicii morfometrici măsurați la nivelul jejunului dar și al ileonului, au avut cele mai mari valori la LE3 (10g/kg tescovină) și cei mai mici la LE1 (1g/kg tescovină). Limfonodulii măsurați în jejun și ileon au avut cele mai mari dimensiuni la doza de 10g/kg tescovină. Această doză a promovat cea mai bună morfostructură și în cecumul porcilor. La LE3 au fost observate cele mai lungi glande intestinale, cele mai numeroase celule caliciforme și cei mai numeroși limfonoduli în cecumul porcilor. Concluzia acestui capitol a fost că doza recomandată pentru promovarea morfoarhitecturii și a țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale s-a produs la doza de 10g/kg tescovină de struguri negri ca adaos în hrana porcilor.

Capitolul 8 se intitulează **"Expresia imunohistochimică a markerilor pro-inflamatori (IL-1 β , TNF- α și MCH-II) și redox (Nrf2 și p65) la nivelul intestinului pentru porcii hrăniți cu pulbere de tescovină de struguri negri"**. Scopul acestui capitol a fost de a urmări evoluția inflamației și a puterii antioxidante a tescovinei de struguri negri atunci când a fost adăunată dietei porcilor, prin tehnica imunohistochimică.

Porcii (n=50) la începutul experimentului au avut aceeași vârstă și aceleași greutate. Aceștia au fost împărțiți în 4 loturi experimentale și un lot martor (câte 10 porci/lot), fiind hrăniți timp de 3 luni astfel: LM (dietă de bază), LE1 (dietă de bază +1g/kg tescovină), LE2 (dietă de bază + 5g/kg tescovină), LE3 (dietă de bază +10g/kg tescovină) și LE4 (dietă de bază + 15g/kg tescovină). Efectul polifenolilor din tescovina de struguri negri a redus expresia markerilor pro-inflamatori în tubul digestiv (intestin subțire și cecum). Expresia IL-1 β a fost

cea mai puternică la LM în toate segmentele tubului digestiv analizate. Dintre loturile experimentale, cea mai intensă colorare (++++) a fost în duoden la LE1 și LE2, în jejun la LE1, LE2 și LE4; și în cecum LE1. Cea mai slabă expresie a lui IL-1 β (+) a fost în ileon la LE3 și LE4, iar în cecum la LE3. Expresia TNF- α a fost cea mai intensă (++++) la LM în toate zonele studiate. Cea mai slabă colorare (+) a fost în duoden la LE3 și LE4, în jejun, ileon și cecum la LE3. Pentru markerul MCH-II, cea mai puternică (++++) expresie a fost în duoden la LM, iar în jejun, ileon și cecum la LM și LE1. Cea mai slabă (+) expresie a fost observată în duoden la LE3 și LE4, iar în jejun și cecum la LE3.

Pentru a analiza raportul redox la nivel intestinal, au fost urmărite în paralel rezultatele expresiilor a doi markeri: Nrf2 și p65. Cea mai slabă expresie (+) a Nrf2 a fost în duoden, jejun și ileon la LE1, pe când cea mai puternică expresie (++++) a p65 a fost în jejun și cecum la LE1. Cea mai puternică colorare (++++) a Nrf2 a fost în duoden, jejun, ileon și cecum la LE3, iar cea mai slabă colorare (+) a p65 a fost în duoden și cecum la LE3 și LE4, iar în jejun la LE3. Cele mai slabe expresii ale markerilor pro-inflamatorii dar și cel mai bun raport redox în intestinul porcilor hrăniți cu tescovină de struguri negri, au fost obținute la doza de 10g/kg.

Capitolul 9 este intitulat "**Cercetări privind evoluția parametrilor performanței de creștere a porcilor hrăniți cu o dietă suplimentată cu tescovină de struguri negri**", având ca principal scop de a calcula parametri de creștere (ADFI, ADG, TCF și greutatea inițială) și de a stabili performanța porcilor hrăniți cu un ados de tescovină de struguri negri.

Un total de 50 de porci cu aceeași greutate inițială și vârstă, au fost împărțiți câte 10 porci în 4 loturi experimentale și un lot martor. Timp de 3 luni, porcii au fost hrăniți cu adosuri de tescovină în următoarele doze: LM (dietă de bază), LE1 (adaos de tescovină 1g/kg), LE2 (adaos de tescovină 5g/kg), LE3 (adaos de tescovină 10g/kg) și LE4 (adaos de tescovină 15g/kg). Cele mai mari valori ale greutății finale ADFI și ADG, au fost obținute introducând în hrana porcilor 10g/kg tescovină de struguri negri (LE3). Porcii care au fost hrăniți cu 1g/kg tescovină de struguri negri au fost cei mai slabi la ultima cântărire, și cu cele mai mici valori pentru ADG și ADFI. Cea mai bună rate de conversie a furajelor a fost la LE3.

Teza se încheie cu concluziile generale.

ABSTRACT

This doctoral thesis, entitled "RESEARCH ON THE EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON THE DIGESTIVE TUBE IN INTENSIVELY RAISED PIGS", was elaborated according to the methodology for writing a doctoral thesis, comprising 2 parts: the first part summarizes the current state of the literature in the field of the thesis, followed by the second part, where the results obtained from our own research on the topic are reported.

The first part of the thesis consists of 3 chapters summarizing information on the morphophysiology of the oral cavity, salivary glands, stomach and intestinal tract (small and large) of the Pietrain pig; the intestinal immune system with emphasis on the lymphoid tissue associated with the intestinal mucosa and the use of grape polyphenols as antioxidants in pigs with the description of their chemical structure, bioavailability and bioeffects at the intestinal level.

The second part of the thesis comprises 6 chapters which: state the aim and objectives of the thesis; and also report the results of research on the histological and physiological peculiarities of the small intestine, strictly in Pietrain pigs and the response induced by black grape tescovine added to the diet on intestinal health and productive indices in pigs.

All of the above is presented in 51 original figures and 10 tables, and is consulted by 496 bibliographical references.

Chapter 4 is entitled "**Aim and Objectives of the Thesis**", highlighting the main objectives for the realization of the thesis:

- Histological evaluation of the small intestine in Pietrain pigs, with emphasis on the analysis of the height of the intestinal villi, the depth of the Lieberkühn crypts, the morphology of the columnar epithelium with striated plateau, the number of goblet cells, the cell populations infiltrating the lamina propria, the thickness of the mucosal musculature and the lymphoid tissue present in the jejunum and ileum;
- To follow the intestinal mucosal response after challenge with grape tescovine polyphenols in pig feed over a 3-month experimental period. In this study, variations in the height of intestinal villi, length of Lieberkühn's glands, villous height/crypt depth

ratio and the dimensions of the lymphopods making up the Peyer's plaques were calculated;

- Inumohistochemical technique to highlight the reduction of some pro-inflammatory markers and to promote those responsible for the induction of the antioxidant effect at intestinal level, following the inactivation of black grape tescovine in the basic diet of pigs for 3 months;
- Calculation of indices reflecting production efficiency in intensively reared pigs fed black grape tescovin.

Chapter 5 is entitled "**The organizational framework in which the research was carried out**". This chapter describes the herd of pigs used in the thesis experiments, giving details of the breed, age and rearing conditions applied on the farm. The diet with black grape tescovine is also described in terms of total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity.

Chapter 6 is entitled "**Investigations on morphostructural and functional particularities of the small intestine in Pietrain pigs**" with the main aim of highlighting the physiological and histological differences in the small intestine of Pietrain pigs.

The pigs (n=10) were included in the experiment at 180 days of age and an average weight of 85.09 ± 5.11 kg. The feed received was a complete pelleted fattening pelleted feed given ad libitum for 90 days. At the end of the experimental period, the pigs were slaughtered in a slaughterhouse and the small intestine was removed. The research then continued to the laboratory where histologic preparations were obtained.

The mucosa of the duodenum had an average thickness of $960\mu\text{m}$, consisting of intestinal villi ($250\mu\text{m}$), glandular layer in the lamina propria ($420\mu\text{m}$) and muscularis mucosae ($25\mu\text{m}$). The surface epithelium is columnar with a striated plateau and consists of numerous enterocytes and goblet cells. Enterocytes vary in size depending on their position: in Lieberkühn's glands (where they originate) they are cubic in shape, gradually growing to a prismatic shape at the base of the villi ($17\mu\text{m}$ high) and at the apex of the villi ($30\mu\text{m}$ high). The height of the microvilli is lower in enterocytes at the base of the villi ($0.5\mu\text{m}$) and higher ($1.5\mu\text{m}$) for those at the apex of the villi. Bruke's muscle is found at the central axis of each villi and originates from the muscle fibers of the muscularis mucosae. The thickness of this muscle can reach up to $50\mu\text{m}$. The thickness of the submucosa can reach up to $500\mu\text{m}$, here the mixed Brünner's glands are found, which are made up of both serous and mucosal

secretory units. The muscularis consists of the inter layer with the muscle fibers arranged circularly (200µm) and the outer layer with the fibers oriented longitudinally (125µm). Between these layers of muscle is located the Auebach's vegetative myenteric nervous plexus. The last tunic of the duodenum is the serosa with a thickness of up to 80µm. In jejunum, the highest values were obtained for total mucosal height (1006µm), villous height (246µm) and the longest length of Lieberkühn glands (604µm). Higher villi means a larger absorptive surface area, hence better digestion and absorption in the jejunum. Also more goblet cells were observed in the jejunum than in the duodenum.

The most important structures observed in the distal submucosa of the jejunum, but also in the ileum are Peyer's plaques. These lymphoid formations are large in both jejunum (985µm) and ileum (760µm) and imprint the submucosa with a thickness twice that found in the duodenum.

In the ileum the smallest values were recorded for the total thickness of the mucosa (454µm), for the height of the villi (125µm) and the length of the intestinal glands (347µm) and the highest value for the thickness of the muscularis mucosae (80µm). This explains the fact that the main function of the ileum is not in digestion and absorption, but in immune defense through the lymphoid tissue associated with the mucosa, which is highly developed.

The muscle belonging to both the jejunum and the ileum thickens as it approaches the large intestine. Although the thickness increases for both layers of muscle in the muscularis (circular and longitudinal), they remain proportionally equal.

The enteric nervous system takes part in both modulating the gut immune response and digestion. Nerve fibers, following impulses from adrenergic and cholinergic neurons, release neuropeptides with modulatory functions.

Pietrain pigs have a high productive performance due to the correlations formed between the morphoarchitecture of the intestinal tract, the neuro-endocrine messages and the resistant lymphoid tissue in the small intestine.

Chapter 7 is entitled "**Histologic analysis on the reactivity of the intestinal mucosa following the introduction of grape tescovine in Pietrain pigs**". The main aim was to observe what effects the inclusion of black grape tescovine in pigs' feed has on the histologic appearance of the digestive tract. The experiment was carried out in an intensive system with pigs (n=50) of the same age (180 days) and initial weight (85.09 ± 5.11 kg). In order to find the optimal dose of tescovine for the diet of pigs that can modify the morphology of the

intestinal mucosa and submucosa, it was administered in different gram doses for 3 months. The total group of animals was also divided into smaller experimental groups according to the dose of tescovine, resulting in the following experimental protocol: LM (10 pigs on basal diet), LE1 (10 pigs on 1g/kg tescovine), LE2 (10 pigs on 5g/kg tescovine), LE3 (10 pigs on 10g/kg tescovine) and LE4 (10 pigs on 15g/kg tescovine).

The effects of tescovine throughout the experiment on the small intestine were represented by significant changes in the mucosal structure as well as in the lymphoid tissue associated in the intestinal mucosa. At the dose of 10g/kg, in the duodenum, the highest values were observed for the height of the intestinal villi, the depth of the crypts, as well as the ratio between them. The lowest values for intestinal morphoarchitecture were reported in LE1, with values approximately equal to those of LM.

Morphometric indices measured in the jejunum and ileum had the highest values at LE3 (10g/kg testis) and the lowest at LE1 (1g/kg testis). Lymph nodes measured in the jejunum and ileum were largest at 10g/kg tescovine. This dose also promoted the best morphostructure in the cecum of pigs. LE3 had the longest intestinal glands, the most numerous goblet cells and the most numerous lymph nodes in the cecum of the pigs. The conclusion of this chapter was that the recommended dose to promote the morphoarchitecture and associated lymphoid tissue of the intestinal mucosa occurred at the dose of 10g/kg black grape tescocholine as an addition to the pigs' feed.

Chapter 8 is entitled "**Immunohistochemical expression of pro-inflammatory (IL-1 β , TNF- α and MCH-II) and redox (Nrf2 and p65) markers in the intestine of pigs fed black grape tescovin**". The aim of this chapter was to follow the evolution of inflammation and antioxidant potency of black grape tescovin when added to the pigs' diet, by immunohistochemical technique.

The pigs (n=50) at the beginning of the experiment were of the same age and weights. They were divided into 4 experimental groups and a control group (10 pigs per group) and fed for 3 months as follows: LM (basal diet), LE1 (basal diet +1g/kg tescotin), LE2 (basal diet + 5g/kg tescotin), LE3 (basal diet +10g/kg tescotin) and LE4 (basal diet + 15g/kg tescotin).

The effect of black grape tescovine polyphenols down-regulated the expression of pro-inflammatory markers in the digestive tract (small intestine and cecum). The IL-1 β experiment was most potent in LM in all digestive tract segments analyzed. Among the experimental groups, the most intense staining (+++) was in the duodenum in LE1 and LE2,

in the jejunum in LE1, LE2 and LE4; and in the cecum LE1. The weakest expression of Il-1 β (+) was in the ileum in LE3 and LE4, and in the cecum in LE3. TNF- α expression was most intense (+++) in LM in all areas studied. The weakest staining (+) was in the duodenum in LE3 and LE4, in jejunum, ileum and cecum in LE3. For the MCH-II marker, the strongest (+++) expression was in the duodenum in LM, and in jejunum, ileum and cecum in LM and LE1. The weakest (+) expression was observed in the duodenum in LE3 and LE4, and in the jejunum and cecum in LE3.

In order to analyze the redox ratio at the intestinal level, the expression results of two markers were followed in parallel: Nrf2 and p65. The weakest expression (+) of Nrf2 was in the duodenum, jejunum and ileum in LE1, whereas the strongest expression (+++) of p65 was in the jejunum and cecum in LE1. The strongest staining (+++) of Nrf2 was in duodenum, jejunum, ileum and cecum in LE3, while the weakest staining (+) of p65 was in duodenum and cecum in LE3 and LE4, and in jejunum in LE3. The weakest expression of pro-inflammatory markers but also the best redox ratio in the intestine of pigs fed black grape tescovin was obtained at a dose of 10g/kg.

Chapter 9 is entitled **”Investigations on the evolution of growth performance parameters of pigs fed a diet supplemented with black grape tescovin”** with the main aim to calculate growth parameters (ADFI, ADG, TCF and initial weight) and to establish the performance of pigs fed a black grape tescovin admixture.

A total of 50 pigs of the same initial weight and age were divided 10 pigs each into 4 experimental groups and a control group. For 3 months, the pigs were fed with tescovin adducts at the following doses: LM (basal diet), LE1 (tescovin adduct 1g/kg), LE2 (tescovin adduct 5g/kg), LE3 (tescovin adduct 10g/kg) and LE4 (tescovin adduct 15g/kg).

The highest values of final weight, ADFI and ADG, were obtained by feeding 10g/kg black grape tescovin (LE3). Pigs that were fed 1g/kg black grape tescovin were the weakest at last weighing, and had the lowest ADG and ADFI values. The best feed conversion rates were at LE3.

General conclusions end the thesis.

PARTEA I

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

PART I

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. MORFOFIZIOLOGIA TUBULUI DIGESTIV LA PORC

MORPHOPHYSIOLOGY OF THE DIGESTIVE TRACT IN PIGS

1.1. Particularități histologice ale cavității bucale și ale glandelor salivare la porc

1.1.1. Cavitatea bucală

La porc, specific speciei, sistemul digestiv prediafragmatic începe cu cavitatea orală (*Cavum oris*) deschisă de râț (Rostrum) format prin dezvoltarea exagerată a buzei superioare (*Labium superius*) ce se unește cu vârful nasului. Buza inferioară (*Labium inferius*) este scurtă, ascuțită și acoperită de cea superioară, descriind împreună două comisuri labiale adânci (*Angulus oris dexter et sinister*). Buzele prezintă o zonă externă cu o piele subțire acoperită de epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat și o zonă de tranziție spre mucoasa labială. Zona externă conține foliculi piloși, o bogată vascularizație și numeroase terminațiuni nervoase senzoriale. Scheletul buzelor conține mușchiul orbicular al buzelor, fiind un mușchi striat de tip scheletic (Bacha și Bacha, 2003; Banks, 1993; Diaz del Consuelo și col., 2005).

În cavitatea orală alimentele ingerate sunt masticate și lubrefiate prin salivă. Cum alimentele sunt fizic mărunțite în cavitatea orală, aceasta este căptușită de un epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat care, de asemenea, căptușește suprafața labială internă a buzelor. Acest epiteliu protector se află pe o membrană bazală și un țesut conjunctiv bogat în fibre de collagen. Dinții, limba, buzele, obraji și palatul acționează împreună în ingestia și fragmentarea alimentelor, care trec apoi în esofag prin acțiunea limbii și a musculaturii faringelui în timpul deglutiției. Înghițirea bolului alimentar este facilitată de secreția salivară.

Limba este un organ musculo-membranos, alcătuit dintr-o rădăcină, un corp și un vârf. Musculatura limbii este formată din benzi de mușchi striați de tip scheletic, așezate în mai multe planuri și separate între ele de un țesut conjunctiv. *Lamina propria* a limbii este populată de numeroase glande accesorii cu unități secretorii acinare seroase și mucoase (Bacha și

Bacha, 2003; Pawlina și col., 2016). Mucoasa linguală este pliată neregulat și specializată pentru recepția gustativă și senzorială. Pe fața dorsală, mucoasa prezintă mai multe tipuri de papile linguale (*Papillae linguales*), iar pe fața ventrală a limbii, mucoasa este netedă. Sunt descrise patru tipuri de papile linguale la porc: cele mai numeroase sunt papilele filiforme localizate pe fata dorsala si orientate aboral, papilele fungiforme sunt diseminate pe fata dorsală și marginile laterale, papilele foliate sunt plasate pe marginile laterale și papilele valate sunt localizate dorsal. Din punct de vedere histologic, papilele sunt alcătuite dintr-un ax central de țesut conjunctiv ce provine din *lamina propria*, și un epiteliu de acoperire pavimentos stratificat necheratinizat. În cazul papilelor valate și foliate, sunt prezenți mugurii gustativi, localizați la baza papilelor în structura epitelului (Diaz del Consuelo și col., 2005; Krause, 2005). Percepția gustului este influențată de anumiți factori: glandele Ebner de la baza papilei ce produc o secreție apoasă, trecerea acestui lichid într-un flux continuu la nivelul șanțurilor adânci peripapilare, percepția gustului prin stimularea microvililor celulelor receptoare din mugurii gustativi, depolarizarea membranei celulare, eliberarea neuromediatorilor pentru fibrele nervoase aferente ce duc, în final, informația neuronilor gustativi din sistemul nervos central (Chamorro și col., 1993) au cuantificat papilele gustative la porc și au relevat un număr cuprins între 818 și 637 de papile fungiforme și 2 papile valate la porcine.

Porcul are o dentiție heterodonta (dinții sunt diferențiați în incisivi, canini, premolari și molari), dihidodontă (dentiție de "laptele" până la 8 luni și definitivă până la 2 ani) și bunodontă (molari cu tuberculi rotunjiți). Purceii se nasc cu dinții de "laptele" complet erupți. Majoritatea premolarilor decidui erup între prima și a cincea săptămână de viață, urmați de alți dinți decidui care sunt înlocuiți de dinții permanenți în timp. Formula dentară completă este alcătuită din 44 de dinți din care: 3 perechi de incisivi folosiți pentru prinderea și forfecarea alimentelor, 1 pereche de canini cu rol de rupere, 4 perechi de premolari care macină grosolan nutrețurile și, în final, 3 perechi de molari care strivesc furajele în particule mai mici (Tucker și Widowski, 2009).

1.1.2. Glandele salivare

Saliva este secretată de trei glande salivare majore: glandele parotide, glandele mandibulare și glandele sublinguale, la care se adaugă o serie de glande minore (labiale,

linguale, bucale, și glandele palatine). Saliva este un lichid complex ce îndeplinește rol protector, lubrefiant și digestiv. Secreția glandelor salivare minore este continuă și sub influența factorilor locali (miros, gust și compoziția alimentelor), pe când glandele salivare majore secretă sub influența parasimpaticului (salivă apoasă și subțire) sau a simpaticului (salivă bogată în compuși organici), prin stimuli fizici, chimici cât și psihologici. Toate glandele salivare prezintă o capsulă de țesut conjunctiv (*capsula glandularis*) ce emite septe compuse din fascicule de fibre de collagen (*septa interlobularia*) ce se extind în țesutul glandei, dând naștere la lobuli de diferite dimensiuni. În țesutul conjunctiv sunt prezente vasele de sânge, nervi și porțiuni din sistemul canalicular de excreție. Secreția în glandele salivare are loc prin modelul merocrin, unde celulele parcurg diferite etape ale unui ciclu secretor cu finalizarea excreției produșilor prin exocitoză în zona apicală a celulei.

Glanda parotidă (*Glandula parotis*) este foarte dezvoltată la porc, se găsește în loja parotidiană și poate ajunge până la apertura cranială toracică. După forma și alcătuirea adenomerului, glanda parotidă este o glandă acinară compusă având unitatea secretorie, acinul seros. Saliva, care la porc este plină de amilază, este transportată printr-un sistem de canale cu diametre crescând până în cavitatea bucală, unde începe practic digestia carbohidraților. Saliva conține de asemenea imunoglobulina A, lactoperoxidază și lizozim ce joacă rol în apărarea imunitară. Canalul parotidian (Stenson) se deschide la nivelul unei papile salivare în dreptul primului sau a celui de-al doilea molar superior. Din punct de vedere histologic, acinul seros este alcătuit din celule piramidale inserate pe membrana bazală. Datorită formei celulelor (pol apical efilat și bază largă) și a joncțiunilor dintre ele, se formează o structură sferică cu un lumen îngust în mijloc. În zona bazală a celulei se găsește ergastoplasma, între treimea bazală și cea mijlocie se găsește nucleul veziculos, iar în zona apicală sunt vizibile granulele de zimogen. Secreția este fluidă inițial, apoi trecând prin canalele intercalate, striate și cele excretorii, are loc îngroșarea salivei și reglarea conținutului de electroliți al acesteia (Banks, 1993; Krause, 2005).

Glanda mandibulară (*Glandula mandibularis*) se găsește sub glanda parotidă, lângă mușchiul maseter. Este alcătuită dintr-o porțiune aborală globuloasă și o porțiune orală mai redusă. La porc, glanda tubulo-acinară mandibulară este alcătuită din unități mixte secretorii, celulele mucoase fiind acoperite de demilune seroase (Burmester și col., 2003). Celulele mucoase sunt cilindrice, cu nucelul aplatizat la margine, iar în polul apical sunt evidențiate numeroase granule de mucigen. Secreția mucoasă se amestecă cu cea seroasă într-un lumen

mai larg și nu suferă modificări pe parcursul ductelor intercalate și striate excretoare (Young și col., 2013). Secreția este condusă prin canalul mandibular (Wharton) ce se deschide în cavitatea bucală la nivelul frâului limbii.

Glanda sublinguală la porc este alcătuită din glanda sublinguală monostomatică (*Glandula sublingualis monostomatica*) și glanda sublinguală polistomatică (*Glandula sublingualis polystomatica*). Porțiunea monostomatică este plasată în fața glandei mandibulare, având o formă alungită și un singur canal sublingual mare care se deschide împreună cu cel mandibular la nivelul frâului limbii. Porțiunea polistomatică este mai dezvoltată și este deservită de mai multe canale scurte sublinguale, ce se deschid fie în canalul mare sublingual, fie direct în cavitatea bucală, la nivelul spațiilor sublinguale laterale (Banks, 1993; Burmester și col., 2003). Glanda sublinguală este o glandă tubulo-acinară ce are ca și unitate morfo-secretorie, acinul mixt. Ca și în cazul glandei mandibulare, celulele mucoase ocupă două treimi din volumul acinului alcătuind tubi glandulari, iar o treime este ocupată de demiluna seroasă. Sistemul de canale excretorii este mai puțin dezvoltat față de celelalte glande salivare mari, în special vorbind despre canalele intralobulare (Bacha și Bacha, 2003).

Faringele (*Pharynx*) este un conduct musculo-membranos, lung și îngust, unde calea digestivă se intersectează cu calea respiratorie și se continuă cu esofagul. Mucoasa faringiană este îngroșată datorită prezenței unor foliculi limfoizi ce corespund amigdalei faringiene (*Tonsilla pharyngea*).

Esofagul (*Esophagus*) este un tub muscular scurt și drept, ce conduce de la faringe, bolul alimentar în stomac. Acesta este divizat în zona cervicală, zona toracică și zona abdominală. Specific porcului este prezența unei singure stricturi în treimea mijlocie a esofagului și prezența mușchiului tiro-esofagian. Trecerea bolului alimentar este posibilă prin relaxarea sfîcterelor esofagiene și a mișcărilor peristaltice controlate de sistemul nervos vegetativ (Bacha și Bacha, 2003). Peretele esofagului prezintă structura tipică a organelor digestive tubulare: mucoasă, submucoasă, musculoasă și adventiție. Mucoasa esofagiană este alcătuită dintr-un epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat, susținut pe un țesut conjunctiv lax (*lamina propria*) și un strat de celule musculare netede dispuse longitudinal (*muscularis mucosae*). Submucoasa este alcătuită dintr-un țesut conjunctiv în care predomină fibrele elastice ce permit distensia peretelui când trece bolul alimentar prin esofag, vase de sânge și terminații nervoase. În treimea superioară a esofagului, în submucoasă se găsesc de asemenea, glande salivare minore cu secreție mucoasă, care se deschid în lumen, traversând toate

straturile mucoasei. Un aspect particular la porc este prezența foliculilor limfoizi în apropierea glandelor mucoase din submucoasă. Tunica musculară conține mușchi striati în treimea anterioară, transformându-se în mușchi neted în apropierea stomacului. Fibrele musculare netede descriu un strat longitudinal extern și unul circular intern. Stratul extern al esofagului în cavitatea toracică este reprezentat de o adventiție, iar în cavitatea abdominală este prezent în plus un mezoteliu ce acoperă țesutul conjunctiv și formează un țesut mezoteliu-fasciculat (Krause, 2005).

1.2. Particularități histologice ale stomacului la porc

Stomacul reprezintă o dilatare a intestinului primitiv și joacă rol în preluarea bolului alimentar de la esofg, depozitarea temporară a alimentelor, digestia parțială a acestora și livrarea spre următorul segment digestiv. Din punct de vedere histologic, stomacul la porci prezintă 4 tunici: mucoasă, submucoasă, musculară și tunica externă sau seroasă. Mucoasa este alcătuită dintr-un epiteliu de acoperire ce descrie infundibulii gastrice și diferite glande în funcție de zona gastrică, *lamina propria* dată de un țesut conjunctiv cu rol nutritiv și de suport; și *muscularis mucosae* reprezentat de mai multe straturi fine de fibre musculare netede.

La suine, stomacul (*gaster, ventriculus*) prezintă o singură cameră, căptușită de o combinație de mucoasă glandulară și aglandulară, delimitând 4 zone: regiunea esofagiană, cardia, corpul stomacului (zona fundică) și zona pilorică. Diferențele în structura stomacului, inclusiv a mucoasei gastrice, reflectă modul de furajare a porcilor.

Regiunea esofagiană (*pars esophagea*) este o continuare a esofagului și este căptușită la interior de un epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat. Restul de mucoasă gastrică este glandulară și prezintă la suprafață infundibuli (*glandulae gastricae*) rezultați din invaginarea epitelii columnar specializat în secreția de mucus. Celulele din epiteliul glandelor, sunt specializate în secreția de mucus alcalin, în care predomină apa, bicarbonatul, lipazele și proteazele (Solcan, 2018; Woods, 2004). De asemenea, celulele epiteliale gastrice sunt susținute ferm împreună prin joncțiuni stânse (*zonulae occludentes*) și joncțiuni GAP (*nexus*). Învelișul mucos împreună cu joncțiunile dintre celule, sunt bariere în prevenirea lizei stratului epitelial de către suc gastric acid (Young și col., 2013). Infundibulii gastrici se deschid la

suprafața mucoasei și se vor continua în grosimea mucoasei, cu diferite glande în funcție de localizare.

Glandele cardiale (*pars cardiaca*) se întind pe o treime din suprafața luminală totală, încorporând *diverticulum ventriculi* și jumătate din corpul stomacului. Glandele cardiale sunt de obicei ramificate și tubulare încolăcite, care se varsă printr-un "gât" scurt la baza infundibililor gastrici (*foveolae gastricae*). Porțiunea terminală a glandelor este largă. Epiteliul glandular este cuboidal până la columnar și produce o secreție mucoasă alcalină care conține lizozim (Woods, 2004). Secreția glandei cardiale poate fi considerată a avea efecte umidificatoare și lubrifiante. Prezența unui epiteliu protector gros la intrarea stomacului și a glandelor cardiale adiacente, cu numeroase celule de mucus pot fi un răspuns la alimentația de tip omnivoră a porcilor (Fothergill și col., 2019). Celulele principale sunt uneori prezente în cadrul epitelului. În plus față de aceste celule glandulare exocrine, regiunea glandei cardiace a stomacului de porc mai conține celule glandulare endocrine, care pot fi identificate cu ajutorul tehnicilor de colorare cu argint și imunohistocitochimice. Aceste celule fac parte din sistemului endocrin gastrointestinal, iar secreția lor (serotonina, somatostatina și endorfinele) trece în rețeaua capilară a peretelui stomacal (Woods, 2004).

Zona fundică (*fundice*) sau gastrică propriu-zisă la porc este alcătuită din infundibuli ce se continuă cu 3-7 glande fundice tubuloase simple, lungi și mai puțin ramificate decât glandele cardiale. Glandele fundice își parcurg traseul prin *lamina propria* până la *muscularis mucosae*, fiind înconjurate de țesut conjunctiv, vase, nervi, celule musculare netede și infiltrate celulare. Glandele gastrice propriu-zise sunt compuse din trei regiuni: istm: celule istmice (*epitheliocytus nondifferentiatus*), gât (col glandular): celule cervicale (*mucocytus cervicalis*) și porțiunea bazală (*pars principalis*); caracterizate de tipuri de celule distincte din punct de vedere structural și funcțional: celule principale (*exocrinocytus principalis*), celule parietale (*exocrinocytus parietalis*) și celule endocrine (*endocrinocytus gastrointestinalis*) (Woods, 2004).

Istmul este porțiunea glandei situată la baza infundibililor gastrici din care se dezvoltă glanda propriu-zisă. Conține un epiteliu cuboidal, ce este continuarea mucoasei epiteliale de la suprafață. Celulele cresc în înălțime pe parcursul acestei tranziții. Celulele istmului provin dintr-un nucleu de celulele stem care de obicei, nu sunt complet diferențiate (*epitheliocytus nondifferentiati*). Celulele stem se divid mitotic și migrează spre suprafața luminală pentru a înlocui celulele mucoase superficiale, sau vor migra în jos pentru a se

diferenția în celule mucoase cervicale, enterocromafine sau în celule principale. Ca și celulele epiteliale care căptușesc infundibulii gastrici, sunt prezente și celule producătoare de mucus ce contribuie la protejarea epitelului (Solcan, 2018).

Regiunea gâtului conține celule parietale (oxintice) și celulele mucoase ale gâtului (*mucocyti cervicales*). Apărând individual sau în grupuri, celulele mucoase cervicale diferă în structură și funcție față de celulele istmului. Celulele cervicale sunt de formă cuboidală și, de obicei, se colorează slab. Nucleul ocupă o poziție bazală, iar acumularea de granule secretorii face ca suprafața apicală a celulei să fie proeminentă în lumen. Mucusul produs de celulele gâtului este acid, de vâscozitate relativ scăzută și relativ bogat în glicozaminoglicani. Stratul format de combinația acestui mucus și a celui produs de celulele istmice și de suprafață protejează epiteliul împotriva atacurilor proteolitice și activitatea hidrolitică a proteazelor și a ionilor de H^+ secretați de către celulele parietale (Bacha și Bacha, 2003).

Învelișul epitelial de la baza glandei fundice încorporează numeroase celule exocrine: celule principale și celule parietale. Sunt prezente, de asemenea, celule endocrine ale sistemului enteroendocrin al tractului gastrointestinal. Celula principală (*exocrinocytus principalis*) este cuboidală sau piramidală, cu citoplasmă ușor bazofilă. Nucleul oval este de obicei situat în treimea bazală a celulei. Tipic pentru celulele cu un nivel ridicat de activitate secretorie, celulele principale sunt bogate în organite asociate cu sinteza proteinelor. Celulele principale conțin granule de zimogen care, în faza de secreție activă, determină bombarea apicală a celulelor. Celulele principale secretă pepsinogen care se va transforma în pepsină în mediul acid al stomacului (Bacha și Bacha, 2003). Celula parietală (*exocrinocytus parietalis*) este o celulă rotunjită, în formă de pară, puternic acidofilă, cu nucleu sferic central și care se interpune între, sau se află la periferia celulelor principale. Celule parietale apar pe tot peretele glandelor tubulare, în special în secțiunea mediană, și se caracterizează prin prezența unor mitocondrii abundente care conțin în special numeroase criste. Structurile tubulovesiculare acumulează sub plasmalemă în timpul stadiului inactiv al celulei parietale. În plus, celulele parietale conțin un sistem de canaliculi intracelulari (*canaliculi intracellulares*) care mărește suprafața pe care poate avea loc secreția. În timpul fazei de secreție activă, numărul de microvili care căptușesc canaliculele crește, în timp ce sistemul tubulovesicular regresează. Celulele parietale care sunt active, secretă ioni de Cl^- și ioni de K^+ . Sub acțiunea anhidrazei carbonice prezentă în celulele parietale, acidul carbonic este disociat în bicarbonat HCO_3^- și H^+ . Bicarbonatul este preluat de circulația sângelui, iar ionul de H^+ este eliberat prin pompa

H^+/K^+ doar prin resorbția intracelulară de K^+ . Acidul clorhidric disociat (H^+ și Cl^-) este secretat în canaliculi (Young și col., 2013).

Celulele endocrine intraepiteliale (*endocrinocyti gastrointestinales*) se găsesc în special în zona mijlocie și secțiunile terminale ale glandei. Împreună cu celulele endocrine ale pilorului și ale intestinului subțire, precum și celulele endocrine ale pancreasului, aceste celule aparțin sistemului endocrin gastroenteropancreatic (GEP). Celule endocrine care se găsesc în regiunea glandelor gastrice propriu-zise includ celulele enterocromafine (EC) ce sintetizează serotonina, celulele D ce sintetizează somatostatina și celulele G ce sintetizează gastrina. Stimularea nervoasă parasimpatică, prezența alimentelor în stomac și distensia peretelui gastric duc la sinteza gastrinei și eliberarea ei în sânge. Pe urmă, este stimulată secreția de pepsină și HCl precum și motilitatea gastrică. Somatostatina este stimulată de prezența directă a HCl și are rol de a inhiba secreția de hormoni digestivi, având un feedback negativ asupra secreției acide (Eurell și Frappier, 2013).

Glandele pilorice (*glandulae pyloricae*), relativ scurte, sunt situate în *pylorus* și se extind într-o măsură variabilă în corpul stomacului. Ele se deschid de obicei în infundibuli gastrici alungiți și dilatați. Glandele pilorice sunt ramificate, încolăcite și cu porțiunea profundă a lumenului de obicei lărgită. Celula glandulară (*exocrinocytus pyloricus*) este cuboidală până la columnară, cu un nucleu oval și aplatizat din cauza acumulării de mucus. Aceste celule secretă în principal o substanță mucoasă care, de asemenea conține lizozim (Bacha și Bacha, 2003).

Submucoasa stomacului este reprezentată de un strat de țesut conjunctiv dens cu rol de susținere, nutriție și apărare pentru mucoasa gastrică, fiind alcătuită din vase de sânge, vase limfatice, terminații nervoase, infiltrații limfoide, mastocite și macrofage. Plexul lui Meissner este alcătuit din celule și fibre ganglionare care reglează celulele musculare netede din submucoasă și musculatura mucoasei.

Musculoasa gastrică este alcătuită din fibre musculare netede, așezate pe trei straturi și orientate în trei direcții diferite. Stratul intern muscular este așezat oblic (*fibrae obliquae*) și este prezent în zona fundică și zona gastrică propriu-zisă, cel mijlociu este circular și prezent pe toată suprafața stomacului, inclusiv la nivelul orificiilor unde formează sfinctere prin aglomerarea fibrelor musculare, iar stratul extern muscular este orientat longitudinal pe marea și mica curbura. Sfincterul piloric (*torus pyloricus*) controlează traficul bolului alimentar spre intestine prin capacitatea de a deschide sau închide orificiul piloric (Bal și col., 1972). Plexul

lui Auerbach este alcătuit din celule ganglionare ce sunt localizate printre fibrele dintre straturile musculaturii externe care reglează contracția acestora.

Seroasa gastrică este ultima foiță ce acoperă stomacul la exterior. Aceasta este alcătuită dintr-un țesut conjunctiv ce provine din foița viscerală a peritoneului și se continuă cu marele și micul epiplon.

1.3. Particularități histologice ale tractului intestinal la porc

Din punct de vedere macroscopic, intestinul porcului urmează structura general întâlnită la toate mamiferele domestice. Acesta este împărțit în intestinul subțire, format din duoden, jejun și ileon și intestinul gros, format din cecum, colon și rect. De asemenea, la nivel microscopic, peretele intestinal la porc urmează structura clasică, fiind alcătuit de la interior spre exterior din: tunica mucoasă - compusă din epiteliu, *lamina propria* și *muscularis mucosae*; tunica submucoasă; tunica musculoasă - compusă din stratul circular și cel longitudinal și tunica seroasă (Weyrauch și col., 2009).

1.3.1. Intestinul subțire

Procesele digestive începute în porțiunea proximală a tractului gastrointestinal sunt, în cea mai mare parte, finalizate în intestinul subțire (*intestinum tenue*), unde mucoasa, susținută de straturile musculare, are rolul de a digera substanțele nutritive și de a absorbi produsele rezultate din degradare. Descompunerea nutrienților este un rezultat al acțiunii sucului gastric, a secrețiilor glandelor intestinale și a pancreasului, precum și a bilei produse de ficat. Aceste procese transformă componente alimentare în substraturi cu greutate moleculară mică, reglementate de mecanisme neuronale și hormonale (Woods, 2004).

În cazul porcilor, descompunerea proteinelor în aminoacizi are loc în intestinul subțire, iar polipeptidele rezultate sunt ulterior hidrolizate de către enzime precum tripsina și chimotripsina. Polizaharidele sunt descompuse de α -amilaza pancreatică și de α -amilaza intestinală în monozaharide. Trigliceridele, emulsionate în stomac, sunt scindate în intestinul subțire de către lipaza pancreatică, ajutate de sărurile biliare și colesterol. Enzimele pancreatice suplimentare (nucleaze și fosfataze) contribuie la transformarea acizilor nucleici.

Absorbția produselor finale are loc la suprafața epitelului mucosal, utilizând gradienti de concentrație și/sau potențial membranar (Eurell și Frappier, 2013; Woods, 2004; Young și col., 2013).

Acizii grași cu lanț scurt sunt absorbiți direct în capilarele sanguine, ajungând apoi în ficat, în timp ce acizii grași cu lanț lung și monogliceridele sunt preluate în celulele epiteliale și transformate în trigliceride. Acestea sunt apoi transportate sub formă de chilomicroni către capilarele limfatice. Pe lângă secreția de enzime digestive și absorbția, celulele epiteliale produc și secretă mucus pentru protecția suprafeței intestinale și hormoni tisulari. Mucoasa intestinală, pe lângă funcțiile digestive, absoarbe apă, electroliți și vitamine, reprezentând cel mai mare organ limfatic din organism și contribuind activ la răspunsurile immune (Burmester și col., 2003; Woods, 2004).

Diferitele funcții ale intestinului subțire (secreție, absorbție și apărare) depind de în mare măsură de specializări structurale care măresc considerabil suprafața sa internă. Printre acestea se numără pliurile orientate transversal, vizibile macroscopic (*plicae circulares*) care scad treptat în înălțime în segmentele caudale ale intestinului. Axa centrală a pliurilor este alcătuită din țesut conjunctiv ce provine din submucoasă și care iese în afară în lumenul intestinal. În plus, întreaga mucoasă a intestinului subțire este acoperită de vilozități intestinale (*villi intestinales*), evaginații ale laminei proprii asemănătoare unor degete, căptușite cu un epiteliu simplu (*epithelium mucosae*). Glandele Lieberkuhn (cripte) sunt invaginații ale epitelului din jurul vilozităților care sunt predominant căptușite cu celule epiteliale mai tinere față de cele din lungul vilozităților (Etxeberria și col., 2015, Solcan, 2018).

Epiteliul intestinal format dintr-un singur strat de celule este alcătuit în principal din 4 tipuri de celule, care sunt toate descendente ale celulelor stem pluripotente rezidente la baza criptelor (*epitheliocyti nondifferentiati*), ceea ce permite o reînnoire celulară continuă (Massot-Cladera și col., 2014). Fiecare tip se maturizează după criteriul specific funcțional, fie rămân la nivelul criptelor intestinale, fie migrează în afara criptelor în lungul vilozităților; cu toate acestea, distribuția fiecărui tip celular variază în funcție de rolul pe care îl are regiunea în procesul de digestie (Lee și col., 2006; Parkar și col., 2008). Enterocitele (*epitheliocyti columnares villi*) sunt cel mai abundent tip celular din epiteliul intestinal, sunt celule columnare care formează mucoasa absorbantă a tractului intestinal. Celulele au un nucleu eucromatic oval, situat în treimea inferioară sau cea mijlocie, mitocondrii abundente, reticul endoplasmatic și aparat Golgi bine dezvoltat. Polul apical prezintă proiecții microscopice

(microvili) asemănătoare unor degete care au rolul de a mări suprafața de absorbție, pe lângă prezența pliurilor și a vilozităților intestinale. Fiecare microvil prezintă un schelet central format din microfilamente de actină, orientate longitudinal, cuplate cu proteine citoscheletale, care în final sunt conectate cu microfilamente de miozină din citoschelet prin intermediul pânzei terminale. Aceste elemente contractile ale microvililor determină mișcarea citoplasmei și favorizează absorbția apei și a produșilor de digestie. Microvillii formează o margine undulată acoperită de glicocalix constituit din oligozaharide atașate la glicolipidele membranare și glicoproteine, numită platou striat. La nivel apical, enterocitele sunt strâns unite de *zonulae occludentes* și de joncțiunea complexe, împiedicând circulația fluidelor între lumenul intestinal și spațiul intercelular. La baza lor, enterocitele sunt în contact strâns cu lamina bazală de care sunt legate mecanic prin hemidesmosomi (Lee și col., 2006; Parkar și col., 2008):

Celulele caliciforme (*epiteliocyti caliciformes*) sunt interpuse printe enterocite în mucoasa epitelială a vilozităților și a criptelor intestinale și sunt responsabile de secreția stratului de mucus care protejează epiteliul de conținutul luminal (Crozier și col., 2009). Forma lor este rotundă sau ovală, cu nucleul bazal aplatizat și pot fi numite glande monocelulare care produc mucus bogat în glicoproteine și glicolipide. Mucusul este secretat prin modul merocrin al celulelor, pe suprafața mucoasei intestinale, unde protejează epiteliul împotriva autodigestiei enzimatice și a colonizării celulelor epiteliale de către agenții patogeni. Mucusul ocupă receptorii utilizați de microorganisme sau toxine, împiedicând astfel aderența acestora la suprafața epitelială. Prin conținutul său de lizozim, mucusul are, de asemenea, proprietăți bactericide (Young și col., 2013).

Celulele Paneth (*exocrinocyti cum granulis acidophilis*) sau celulele granulare acidofile, sunt situate la nivelul bazal al glandelor intestinale Lieberkühn. Acestea nu au fost demonstrate definitiv în cazul porcilor (Myer, 1982; van Es și Clevers, 2014). Sunt celule în formă de triunghi, cu o bază largă și o zonă apicală mai îngustă cu citoplasmă granulară eozinofilă care produc peptide antimicrobiene și factori de creștere implicați în menținerea celule stem vecine (Manach și col., 2004). Celulele Paneth produc o secreție exocrină seroasă, bogată în glicoproteine, ce conține lizozim și fosfatază. Aceste enzime exercită efecte bactericide prin dizolvarea peretelui celular bacterian și influențează astfel flora microbiană a intestinului (Young și col., 2013).

Celulele enteroendocrine (*endocrinocyti gastrointestinales*) sunt celule endocrine specializate care secretă diverși hormoni în tractusul gastro-intestinal (Thilakarathna și Rupasinghe, 2013). Celulele endocrine sunt prezente în mucoasa glandelor intestinale din partea proximală a intestinului subțire. Aceste celule sunt responsabile de sinteza hormonilor peptidici și a serotoninei (5-hidroxitriptamina), care reglează secreția de enzime digestive, hormoni digestivi și activitatea peristaltică. Împreună cu celule similare din stomac și pancreas, aceste celulele endocrine ale intestinului formează sistemul endocrin gastroenteropancreatic (GEP). Celulele endocrine intraepiteliale își eliberează granulele secretorii către rețeaua capilară imediat adiacentă. Tehnicile imunohistochimice și, în unele cazuri, afinitatea pentru crom și sărurile de argint au permis identificarea conținutului granulelor secretorii citoplasmatiche ca fiind anumiți hormoni peptidici și amine biogene, cum ar fi serotonina, sau precursorii acestora. O caracteristică comună a acestor celule este prezența de granule situate de obicei la bază, care conțin granule de aminoacid decarboxilază. Enzimele implicate în sinteza aminelor biogene sunt denumite aminoacid decarboxilază și se regăsesc în celulele APUD. Aceste celule producătoare de hormoni sunt acoperite de receptori care în urma unui stimul adecvat, vor secreta polipeptidele. Mai multe tipuri specifice de celule producătoare de hormoni au fost identificate, în special în porțiunile mai profunde ale glandelor intestinale din duoden (Woods, 2004).

Celulele D sintetizează somatostatina, care inhibă sinteza secrețiilor gastrice precum gastrina. Aceste celule sunt prezente de asemenea în pancreas și în mucoasa gastrică. Celulele G secretoare de gastrină întâlnite în zona pilorică a stomacului, se găsesc de asemenea în duoden și jejun. Gastrina stimulează activitatea secretorie a celulelor parietale și a celulelor mucoasei gastrice, precum și a celulelor mucoasei intestinale și ale pancreasului. Celulele I produc colecistochinină (CCK), favorizează producerea de bilă de către ficat, contracția vezicii biliare și secreția de enzime digestive de către pancreas (Woods, 2004; Young și col., 2013). Secretina, produsă de celulele S, stimulează producția și secreția de suc pancreatic, bicarbonat de sodiu și bilă (Van Der Flier și Clevers, 2009).

Lamina propria mucoasă este formată din țesut conjunctiv lax și formează nucleul vilozităților intestinale. O mare parte din *lamina propria* este ocupată de glandele intestinale Lieberkühn. Între glande, țesutul conjunctiv este condensat și găzduiește vase de sânge și vase limfatice, fibre nervoase, miofibroblaste și celule musculare netede. Acest strat conține, de asemenea, numeroase celule imune, în agregate de densitate variabilă, și fibre reticulare

(Liebich, 2010). Microvascularizația servește în principal la susținerea activității secretorie a celulelor epiteliale și pentru a transporta produsele de digestie, apa, electroliții și vitaminele. În consecință, fiecare vilozități conține o densă și substanțială rețea capilară. O arteriolă localizată în centrul vilozității, urcă până în vârful acesteia, unde se ramifică în capilare, apoi se anastomozează pentru a forma o rețea subepitelială care se extinde de-a lungul laturilor laterale până la baza acesteia, unde sângele se drenează prin venule postcapilare. Acestea din urmă se combină pentru a forma plexul vascular submucos ce reglează fluxul de sânge. De asemenea, prin centrul fiecărei vilozități trece un capilar limfatic. Chiliferul începe din vârful vilozității ca un vas cu capăt orb și se deschide la baza vilozității într-un plex care se unește cu vasele limfatice colectoare din submucoasa. Vasul limfatic este căptușit cu un epiteliu pavimentos simplu care este specializat pentru absorbția chilomicronilor (Eurell și Frappier, 2013; Krause, 2005). Țesutul conjunctiv al laminei propria este străbătut de rețele de fibre nervoase autonome fine care își au perikarionii în *plexus nervorum submucosus* (plexul lui Meissner). Aceste fibre nervoase controlează secreția celulelor exocrine și endocrine intestinale și reglează funcția mușchilor netezi, inclusiv a fibrelor musculare din pereții vaselor de sânge. Celule musculare netede (vilozități miocitare) provenite din *lamina muscularis mucosae* trec prin *lamina propria* de-a lungul axei longitudinale a vilozității. Aceste celule suferă o contracție ritmică, ceea ce duce la scurtarea și alungirea a vilozității, asemănător unei stații de pompare care ajută la transportul sângelui și a limfei în vasele mai profunde. *Lamina propria* conține agregate dense de țesut limfatic bogat în limfocite T și B, plasmocite, neutrofile, mastocite, eozinofile, monocite și macrofage. Aceste populații de celule sunt de fapt răspunsuri imune care apar în mod continuu în cadrul mucoasei gastrointestinale.

Submucoasa este un strat de țesut conjunctiv fibros comprimat între *muscularis mucosae* și *muscularis propria*. Pe lângă țesutul adipos, vasele și rețele nervoase, submucoasa conține noduli limfatici solitari (*noduli lymphatici solitarii*) și noduli limfatici agregați (*noduli lymphatici aggregati*- plăcile Peyer). În submucoasa sunt localizate glandele Brünner, care sunt o caracteristică histologică definitorie pentru prima parte a duodenului. Din punct de vedere morfo-funcțional sunt glande tubulo-acinare ramificate cu secreție mixtă în cazul porcului. Mucusul secretat este alcalin și amortizează secreția acidă a sucului gastric, protejează mucoasa intestinală și creează un mediu optim pentru acțiunea enzimelor pancreatice (Liebich, 2010). În submucoasa ileonului sunt prezente agregate limfatice sub

formă de noduli care, de obicei, trec de mucoasă pentru a ajunge la suprafața intestinului. În aceste regiuni, epiteliul nu mai ia forma vilozităților. Acesta rămâne uniform peste noduli și se specializează în supravegherea și apărarea imunitară locală prin infiltrare puternică cu celule limfoide (Del Rio și col., 2013; Liebich, 2010).

Musculoasa (*tunica muscularis*) este alcătuită din fibre musculare netede, distribuite pe două straturi: circular intern (*stratum circulare*) și longitudinal extern (*stratum longitudinale*). Conracțiile acestor sunt importante pentru mișcările peristaltice continue, fiind inervate motor de plexul Auerbach (sau plexul mienteric).

Seroasa (*tunica serosa*) reprezintă foița viscerală a peritoneului, alcătuită dintr-un țesut mezotelio-fasciculat.

1.3.2. Intestinul gros

Intestinul gros (*intestinum crassum*) este alcătuit din cecum, colon și rect. La nivel macroscopic, structura acestor segmente variază semnificativ la porc, cu toate acestea, diferențele se reflectă doar într-o anumită măsură în structura histologică a peretelui intestinal. În esență, straturile peretelui intestinului gros se conformează unei structuri de bază pentru un tub musculo-membranos.

Cecumul (*caecum*) are formă cilindrică și aspect boselat, se localizează în partea stângă a abdomenului în fosa paralombară. Forma sa este de fund de sac cu două orificii: un orificiu ileocecal ce comunică cu intestinul subțire și un orificiu cecocolic ce se continuă cu următoarele segmente ale intestinului gros. Colonul este alcătuit din partea ascendentă, transversală și descendentă și se continuă cu rectul, ce prezintă o ampulă rectală evidentă. Un aspect caracteristic pentru porc este forma helicoidală a colonului ascendent, fiind format dintr-o ansa spiralată centripetă (*ansa spiralis coli*) cu aspect boselat, urmată de o flexura centrala (*flexura centralis*), de la care pornește o ansă cu trei ture centrifuge neboselate (*gyri centrifugales*) in sens invers. Colonul transvers și cel descendent, sunt porțiuni scurte și localizate deasupra colonului helicoidal.

Pe măsură ce alimentele parcurg intestinul gros, activitatea secrețiilor intestinale și pancreatice scade treptat (Bacha și Bacha, 2003). Digestia produselor alimentare reziduale, în special hidroliza celulozei, devine responsabilitatea bacteriilor și protozoarelor intestinale, care descompun carbohidrații și proteinele. În cecumul porcului, acizii grași cu lanț scurt sunt

formați anaerob prin procese microbiene digestive, fiind ulterior absorbiți. De asemenea, bacteriile din intestinul gros contribuie la producția de vitamine B și K (Bacha și Bacha, 2003; Banks, 1993). Mucoasa intestinului gros îndeplinește mai multe funcții esențiale, printre care absorbția apei și a electroliților, îngroșarea conținutului intestinal prin schimbul cu calciu și bicarbonat, precum și secreția de mucus din celulele caliciforme pentru lubrifierea materiilor fecale. Absorbția substanțelor nutritive și a vitaminelor are, de asemenea, loc în acest segment al tractului digestiv (Woods, 2004; Young și col., 2013). O caracteristică comună tuturor segmentelor intestinului gros este lipsa vilozităților intestinale. Glandele intestinale sunt căptușită cu un epiteliu columnar, care se continuă în glandele intestinale sub forma unui epiteliu glandular simplu, descriind glande stâns compactate ce ajung până în țesutul conjunctiv al *lamina propria*. În cazul intestinului gros, celulele predominante sunt celulele secretoare de mucus (*exocrinocyti caliciformes*) care sunt rezidente zonelor mijlocii și distale ale glandelor intestinale. Tot la baza glandelor se găsesc și celulele stem ce au rolul de a înlocui celulele epiteliale. Enterocitele (*exocrinocyti columnares*) se găsesc la suprafața glandelor și sunt implicate în absorbția apei și a electroliților din lumenul intestinal. Microviliile sunt dispuși uniform la polul apical al enterocitelor, măresc suprafața disponibilă pentru absorbție și produc deshidratare progresivă a fecalelor. Secreția mucoasă la nivelul intestinului gros este foarte importantă, atât pentru lubrifierea excreției cât și pentru protejarea mucoasei de posibile traume. Musculatura mucoasei este reprezentată de *muscularis mucosae*, fiind alcătuită din fibre musculare netede care se contractă involuntar pentru a împiedica înfundarea glandelor mucoasei.

Submucoasa este alcătuită dintr-un țesut conjunctiv foarte vascularizat, inervat și infiltrat cu celule limfoide. Plexul lui Meissner asigură inervarea senzorială, mototrie și secretorie pentru mucoasa intestinală. Apărarea și imunitatea intestinală este asigurată de bariera limfoidă, care este organizat în noduli limfatici împrăștiați uniform în submucoasa cecumului la porc (Burmester și col., 2003).

Musculoasa (*muscularis externa*) este alcătuită din două straturi de fibre musculare și un ganglion parasimpatic. Leiocitele sunt aranjate într-un stat circular intern și un stat longitudinal extern, cuprinzând la mijloc plexul nervos mienteric Auerbach, ce asigură inervarea motorie a zonei. La porc, în cazul cecumului și a primei jumătăți de colon ascendent, stratul circular intern este uniform și neîntrerupt, pe când statul longitudinal extern se asociază cu fibre elastice și se concentrează în benzi groase numite tenii (*teniae*). Această grupare a

fibrelor din stratul longitudinal extern, oferă primei părți a intestinului gros un aspect exterior boselat, rezultând o serie de depresiuni denumite haustre (*haustrae*) (Bacha și Bacha, 2003).

Seroasa este ultimul strat exterior al intestinului gros, alcătuit din țesut mezoteliiofasciculat. În afara cavității peritoneale, seroasa este înlocuită cu tunica adventice. Acest țesut conjunctiv lax ce înconjoară porțiunea retroperitoneală a rectului, se unește cu un țesut adipos multilocular care se continuă cu țesutul conjunctiv asociat anusului (Bacha și Bacha, 2003).

2. SISTEMUL IMUNITAR INTESTINAL LA PORC

INTESTINAL IMMUNE SYSTEM IN PIGS

Intestinul este un organ care se confruntă cu o provocare antigenică continuă în sub formă de antigene alimentare, antigene din flora bacteriană comensală și antigene ce aparțin agenților patogeni, iar acest lucru duce la necesitatea unui sistem imunitar intestinal. În general, sistemul imunitar este considerat un sistem complex și divers, distribuit în tot corpul, care asigură apărarea gazdei împotriva agenților patogeni (Anhê și col., 2015). În intestin, sistemul imunitar trebuie să dezvolte toleranță, un proces care trebuie să fie bine echilibrat pentru a produce un răspuns adecvat la antigenele alimentare amenințătoare și patologice, precum și să tolereze bacteriile comensale care locuiesc în intestin.

2.1. Țesutul limfoid asociat intestinului (GALT)

Din punct de vedere morfologic și funcțional, sistemul imunitar intestinal este separat în situsuri inductive, cum ar fi plăcile Peyer, complexe limfo-glandulare și ganglionii limfatici mezenterici și situsuri efectoare, populația de limfocitele cantonate în *lamina propria* și a limfocitelor intraepiteliale (IEL) (Sheridan și Lefrançois, 2010). Situsul inductiv se ocupă de procesarea antigenelor și inițierea unui răspuns imunitar adecvat, iar situsul efector are rolul de a genera anticorpi și reacții mediate de celule (Tizard, 2017). Situsurile inductive sunt denumite colectiv țesut limfoid asociat mucoasei (MALT), care include țesutul limfoid asociat mucoasei din intestinului (GALT) (McGhee și Fujihashi, 2012).

2.1.1. Plăcile Peyer

Structuri asemănătoare unor domuri mucoase, cunoscute sub numele de plăcile Peyer (PP), se găsesc de-a lungul mucoasei intestinale și sunt considerate a fi locuri importante pentru coordonarea răspunsurilor imune față de agenții patogeni din intestin și pentru menținerea toleranței la alimente și bacteriile comensale (Makala și col., 2002; Georgescu și col., 2018). Pe baza morfologiei PP-urilor, au fost identificate trei zone clasificate: zona foliculară, zona interfoliculară și epiteliul asociat foliculilor sau FAE (Neutra și col., 2001;

Proca și Solcan, 2020). Atât zona foliculară, cât și zonele interfoliculare conțin aglomerări limfoide cu un rezervor de limfocite B, celule dendritice foliculare și macrofage care cuprind centrul germinativ (Jung și col., 2010). Foliculul este înconjurat de domul subepitelial sau de coronă care include limfocitele B, limfocitele T, macrofage, celule prezentatoare de antigen (APC) și celule dendritice; iar FAE este situat mai extern și formează interfața dintre GALT și micro-mediul luminal (Jung și col., 2010).

La mai multe specii, cum ar fi oile (Reynolds, 1987; Reynolds și col., 1985; Reynolds și Morris, 1983), vițelii (Landsverk, 1984) și porcii (Binns și Licence, 1985; Pabst și col., 1988; Pabst și Binns, 1989; Rothkötter și Pabst, 1989), există două tipuri de PP, definite prin localizarea, structura și funcția lor diferită. Plăcile Peyer sunt distribuite în tot intestinul subțire, în principal în secțiunea distală a ileonului (iIPP) și, într-o măsură mai mică, în jejun (jejPP) (Bono și col., 2000; Rothkötter și col., 1990). La naștere, jejPP și iIPP au morfologie similară, în schimb, în timpul creșterii sale rapide, iIPP dezvoltă trăsături distinctive (Rothkötter și Pabst, 1989). Foliculii limfoizi devin ovoizi, iar zonele interfoliculare și domurile subepiteliale mai mici (Chu și Liu, 1984). Acest lucru coincide cu un număr mai mare de limfocite B și foarte puține limfocite T în foliculii limfoizi ai iIPP. După ce a început involuția iIPP, aceste diferențe dispar (Binns și Licence, 1985; Pabst și Binns, 1989; Rothkötter și col., 1991).

Studiile funcționale privind traficul de limfocite au evidențiat diferențe majore în ceea ce privește gradul de imigrare a limfocitelor: un număr mare de limfocite imigrează în jejPP, în timp ce în iIPP se găsește un trafic celular redus (Pabst și Binns, 1989). Încă nu este clarificat rolul plăcilor Peyer în dezvoltarea ulterioară a limfocitelor B la porc (Butler și col., 2009) deși rezecția postnatală în proporție de 60% din totalul plăcilor Peyer din zona ileală nu a dus la nici o proliferare compensatorie a plăcilor Peyer din zona jejunală, în schimb a avut influență asupra dezvoltării altor organe limfoide (Rothkötter și col., 1990). S-a demonstrat că dezvoltarea postnatală a jejPP și iIPP de porc depinde de conținutul microbial intestinal, deoarece porcii fără germeni au plăcile Peyer din ileon și jejun mai mici (Pabst și col., 1988).

2.1.2. Complexe limfo-glandulare

Nodulii limfoizi sunt prezenți în toate segmentele intestinului gros, cu precădere în colon la deschiderea ileocecală și cu o frecvență crescută în flexura colonică centrală (Klein, 1878; Morfitt și Pohlenz, 1989). Numărul și distribuția acestora a fost raportată în mai multe rapoarte (Inoue și Sugi, 1978). Nodulii limfoizi din colon au fost numiți complexe limfo-glandulare, deoarece sunt adesea formați din mai mulți foliculi limfoizi și zone interfoliculare în submucoasă, cu mai multe cripte ramificate radial care se extind în țesutul limfoid (Morfitt și Pohlenz, 1989; O'leary și Sweeney, 1986). Complexele limfo-glandulare din colonul porcului se aseamănă foarte mult cu omologul său uman (Dukes și Bussey, 1926), iar din punct de vedere histologic, se aseamănă cu alte organe limfoide de prelevare și prelucrare a antigenului, cum ar fi PP și apendicele colonic (Parrott, 1976). Țesutul limfoid este organizat în mod similar în centre germinative și zone interfoliculare, deși pentru a defini clasele de limfocite este nevoie de studii suplimentare la porc.

2.1.3. Limfoepiteliul

O caracteristică constantă a GALT este un limfoepiteliu diferențiat în mod distinct (Bockman și Cooper, 1973; Landsverk, 1981). Epiteliul care acoperă compartimentele limfoide (PP și nodulii limfoizi) (Chu și col., 1979; Lieber și col., 1995; Morfitt și Pohlenz, 1989; Torres-Medina, 1981) poartă denumirea de epitelium asociat foliculilor și constă în mare parte din celule enteroabsorbitive și doar câteva celule M intercalate. Aceste celule M specializate sunt lipsite de un glicocalyx gros, așa cum este întâlnit la enterocite și nici nu secretă mucus ca și celulele caliciforme. Rolul celulele M este de a participa în mod viguros la fagocitoză și transcitoză, prin care preiau antigenele lumenale și le livrează celulelor imunitare din GALT pentru a iniția procesul de răspuns imunitar intestinal (Miller și col., 2007; Ohno, 2016; Proca și col., 2019). Antigenul dobândit prin aceste mecanisme poate fi prelucrat direct în mucoasă (în interiorul epitelului sau subepitelial) sau în țesuturile limfoide asociate mucoasei și în ganglionii limfatici (Schulz și Pabst, 2013; Tizard, 2017). Cu toate acestea, studiile la șoareci au furnizat dovezi că celulele M din plăcile Peyer joacă un rol important în special pentru absorbția de bacterii comensale (Macpherson și Uhr, 2004), în timp ce agenții patogeni sunt preferențial transportați prin intermediul celulelor dendritice în

mucoasa normală (Rescigno și Chieppa, 2005). La porci, citokeratina 18 este un marker pentru celulele M din limfoepiteliu (Gebert și col., 1994). Este interesant faptul că expresia citokeratinei 18 în celulele M a fost găsită numai la porc. Recent, citokeratina 18 a fost observată și în celulele caliciforme porcine și în liniile celulare epiteliale porcine (Schierack și col., 2006).

2.1.4. Ganglioni limfatici mezenterici

Structura ganglionilor limfatici de la porc este diferită de cea a altor mamifere (Binns și Pabst, 1988), principalele distincții fiind dispunerea vaselor limfatice și migrarea limfocitelor. La nivelul ganglionii limfatici, vasele limfatice aferente intră prin hil, iar vasele eferente părăsesc ganglionul prin sinusurile subcapsulare. Limfocitele T și B pătrund în venulele postcapilare paracorticeale (PCV), dintre care multe sunt venule cu endoteliu înalt (HEV). Limfocitele prezintă pe suprafața lor ligandul L-selectină, care recunoaște liganzi bogați în zaharide de pe suprafața HEV. În loc să părăsească prin sinusurile medulare în limfa eferentă, limfocitele T și B aleg să emigreze direct în sânge prin intermediul acestor venule HEV (Binns și Pabst, 1988; 1989), astfel se poate vorbi despre o circulație dubla a limfocitelor la nivelul ganglionilor limfatici. Studii cu ganglioni limfatic perfuzați izolați au făcut ieșirea limfocitelor prin HEV să pară foarte probabilă (Pabst și col., 1985), de asemenea studii ultrastructurale au evidențiat celule de legătură intravasculare unice în HEV din ganglionii limfatici de porc (Sasaki și col., 1994), care ar putea fi baza morfologică a traseului neobișnuit al limfocitelor. În corelație cu această diferență fiziologică majoră, limfa eferentă conține puține limfocite (Bennell și Husband, 1981; Binns și Licence, 1985; Pabst și Binns, 1981; Rothkötter, 2009; Tizard, 2017).

Datorită unui trafic diferit al limfocitelor prin ganglionul limfatic la porc, și a unei structuri histologice unice denumită în literatura de specialitate "inversată", lipsa unui hil tipic cu arteră, venă și vas limfatic eferent, Rothkötter (2009) și Tizard (2013) descriu organizarea structurală în felul următor: ganglionii limfatici sunt alcătuiți din mai mulți noduli limfoizi, înconjurați de "țesutul medular" care de obicei se localizează intern. Fiecare nodul limfoid primește aportul de la un singur vas limfatic aferent. Limfa și celulele însoțitoare sunt drenate într-un sinus înconjurător. În imediata vecinătate a sinusurilor se găsesc zone de celule B dispuse în foliculi (cortex) și zone înconjurătoare de celule T (paracortex) cu HEV.

Aglomerările de noduli limfoizi sunt înconjurate de țesutul medular și, adesea, sunt învecinate cu noduli limfatici adiacenți. Limfa traversează de la centrul ganglionului, trecând prin cortex până la măduva de la periferie, înainte de a părăsi ganglionul prin vasul eferent care îl drenează. Deși morfologia ganglionilor limfatici este diferită, fiziologia zonelor dependente de T și a zonelor dependente de B sunt totuși în linii mari convenționale (Binns, 1982) și îndeplinesc toate funcții tipice ca și la alte specii, de exemplu formarea de anticorpi, eliminarea particulelor și antigenelor și producția de limfocite.

2.2. Răspunsul imunitar al mucoasei digestive

2.2.1. Sistemul imunitar rezident

Sistemul imunitar intestinal este alcătuit din trei nivele de apărare. Ca primă parte a acestuia, există sistemul imunitar rezident ce joacă rol de barieră fizică, fiind alcătuit din: mucus cu proteine antimicrobiene, floră comensală și epiteliul intestinal.

În ciuda prezenței celulelor imunitare, mucusul intestinal joacă un rol crucial în reducerea expunerii sistemului imunitar la antigene și în protejarea împotriva autodigerării (Pelaseyed și col., 2014). Compoziția principală a mucusului este dată de proteina mucină 2 (MUC2), care este produsă în principal de către celulele caliciforme (Johansson și col., 2009; Rodríguez-Piñeiro și col., 2013). În plus, celulele Paneth din criptele intestinale contribuie la producția de peptide și proteine antibacteriene, evidențiind importanța peptidei antimicrobiene α -defensină în asigurarea protecției gazdei (Bevins, 2006; Heazlewood și col., 2008; Nagler-Anderson, 2001; Salzman și col., 2010; Gal și col., 2024; Horodincu și col., 2024).

Din perspectivă evolutivă, relațiile dintre gazdă și bacterii în sistemul gastrointestinal s-au dezvoltat în favoarea reciprocă a ambelor părți. Tractul gastrointestinal al gazdei furnizează un habitat atractiv pentru microorganisme, oferind nutrienți și spațiu pentru supraviețuire. În contrapartidă, microbiota joacă un rol esențial în diverse funcții fiziologice, cum ar fi: regenerarea celulelor epiteliale intestinale, facilitarea procesului de reparație a epitelului, reorganizarea joncțiunilor strânse, întărirea rezistenței la boli și producerea de vitamine și metaboliți benefici (Cullen și col., 2022; Bondar și col., 2023). Microbiota

intestinală interacționează cu gazda prin producerea de metaboliți de fermentație (cum ar fi acizii grași cu lanț mediu și lung, aminele biogene, vitaminele și antimicrobienele), descompunerea nutrienților care altfel nu ar fi digerabili pentru gazdă (precum fibrele alimentare), competiția pentru nutrienți (în special în tractul digestiv superior) și generarea de neurotransmițători (Broom și Kogut, 2018).

Bacteriile care contribuie la procesarea nutrienților și la producerea de energie pentru gazdă sunt implicate în degradarea carbohidraților, în special în descompunerea polizaharidelor de origine vegetală, rezultând acizi grași cu lanț scurt (SCFA) care servesc ca sursă de energie pentru porci, iar unele dintre aceste bacterii au capacitatea de a exercita efecte antiinflamatorii. Printre aceste bacterii degradatoare de polizaharide se numără *Christensenellaceae*, care a fost identificată în fecale (McCormack și col., 2017), ileon (Quan și col., 2018) și cecum (Tan și col., 2017) la porci. *Actinobacillus* poate fi, de asemenea, inclus în această categorie de degradatori de carbohidrați; a fost raportat în cecum și ileon la porci (McCormack și col., 2019, 2017), iar nivelurile ridicate din cecum au fost asociate cu fermentarea polizaharidelor (Nørskov-Lauritsen, 2014).

Bacteriile asociate cu producția de butirat includ *Ruminococcus* (un membru fundamental al microbiomului intestinal al porcilor (Holman și col., 2017) identificat în cecum (Quan și col., 2020, 2018; Tan și col., 2017) și colon (Quan și col., 2018; Vigors și col., 2020); *Butyricicoccus* în cecum (Quan și col., 2020; Tan și col., 2017); *Roseburia* în fecale (McCormack și col., 2019) și cecum (Quan și col., 2020; Tan și col., 2017); și *Lachnospiraceae* în cecum (Quan și col., 2018; Tan și col., 2017). Anumite bacterii din conținutul intestinal sunt cunoscute pentru promovarea sănătății intestinale și prevenirea bolilor, fiind asociate cu o stare generală mai bună. De exemplu, *Oscillibacter*, producător de metaboliți antiinflamatori și utilizat ca probiotic (Li și col., 2016), a fost identificat în cantități mai mari în ileon (McCormack și col., 2017) și în fecalele porcilor (Tan și col., 2017; Yang și col., 2017). *Lactobacillus spp.*, considerat unul dintre genurile de bază ale microflorei comensale la porcii sănătoși și adesea utilizat ca probiotic (Valeriano și col., 2017), este de asemenea prezent în mod regulat în cecum (Quan și col., 2020; Vigors și col., 2020, 2016) și în fecalele porcilor (Yang și col., 2017).

Datorită moștenirii evolutive comune dintre bacterii și animale, și având în vedere faptul că multe gene animale sunt omoloage genelor bacteriene, aceste organisme au capacitatea de a se recunoaște reciproc și de a schimba informații între ele (McFall-Ngai și

col., 2013). De exemplu, semnalizarea provenită de la microbiotă prin intermediul receptorilor toll-like pare să joace un rol important în menținerea homeostaziei epiteliale intestinale (Chow și col., 2010). La rândul său, gazda recunoaște activitatea microbiană prin diverse căi, cum ar fi detectarea metaboliților microbieni prin intermediul proteinelor G (McKenzie și col., 2017) sau a receptorilor de recunoaștere a patogenului (PRR) de pe suprafața celulelor microbiene (Kaiko și Stappenbeck, 2014; Georgescu și col., 2018). Prin urmare, microflora poate comunica cu gazda, iar în mod reciproc, gazda poate trimite semnale către microfloră și, în plus, către agenții patogeni. Diverse specii de microorganisme patogene interacționează între ele și cu agenții patogeni, iar, desigur, agenții patogeni interacționează cu microorganismele, cu gazda și între ei (Sekirov și col., 2010).

Microbiota comensală joacă un rol esențial în prevenirea pătrunderii agenților patogeni externi prin interacțiunea directă cu bacteriile patogene și stimularea sistemului imunitar (Purchiaroni și col., 2013). Bacteriile comensale reglează structura GALT și rețeaua imunitară din *lamina propria*, influențând dezvoltarea și maturarea celulelor sistemului imunitar al mucoasei (Bouskra și col., 2008; Goto și Ivanov, 2013) și generând ulterior producția de IgA (Yanagibashi și col., 2013).

Epiteliul intestinal acționează ca o barieră externă fizică ce facilitează translocația și absorbția nutrienților esențiali, a apei și a electroliților din lumenul intestinal (Blikslager și col., 2007; Broer, 2008; Ferraris și Diamond, 1997; Kunzelmann și Mall, 2002). Totuși, nu permite trecerea antigenelor comensale sau patogene (Blikslager și col., 2007; Podolsky, 1999; Solcan și col., 2015). Această caracteristică contribuie la menținerea unei permeabilități echilibrate (Scaldaferri și col., 2012). Permeabilitatea selectivă a epitelului intestinal este guvernată de două căi principale: calea transcelulară (Yu și col., 2016) și calea paracelulară (Tsukita și col., 2001). Calea transcelulară este responsabilă de transportul de substanțe hidrofobe cu greutate moleculară mică prin enterocite, traversând membranele apicale și bazolaterale (Yu și col., 2016). Acest transport poate avea loc fie independent, fie prin interacțiuni cu transportoare membranare specifice (Gaucher și col., 2010). În ambele căi, gradientul de concentrație este cel care influențează mecanismul de transport prin membrana intestinală (Hillery și col., 2003). Calea paracelulară se referă la transportul prin spațiul dintre celulele epiteliale și depinde de complexe intercelulare localizate de-a lungul membranei laterale care leagă mecanic celulele adiacente și sigilează spațiul intercelular (Cavey și Lecuit, 2009). La nivel ultrastructural, au fost distinse trei componente responsabile pentru contactul

dintre celulele epiteliale intestinale: joncțiunile permeabile, joncțiunile strânse și desmosomii (Hartsock și Nelson, 2008; Holthöfer și col., 2007). Orice alterare a funcției de barieră ar putea conduce la dezvoltarea de boli, asociate și cu perturbări ale barierei imunologice interne a intestinului, afectând astfel funcția imunitară a mucoasei.

2.2.2. Sistemul imunitar înăscut

După cum este prezentat anterior, mare parte din antigene sunt reținute și distruse la nivelul barierelor fizice naturale, dar sunt câteva care reușesc să le depășească cu ajutorul arsenalelor de care dispun și pătrund în organism. Al doilea nivel de apărare al sistemului imunitar intestinal este reprezentat de sistemul imunitar înăscut care reacționează rapid prin mecanisme celulare sau acelulare și fără funcție de memorie (Fukata și Arditi, 2013). Celulele cu rol important funcției imune înăscute sunt celulele prezentatoare de antigen CPA: macrofagele, celulele dendritice (CD), celulele natural killer (NK), granulocitele și mastocitele, care fac parte din microtopografia *laminei propria* (Bimczok și col., 2005; Haverson și col., 2000).

Lamina propria intestinală este în plus față de plăcile Peyer un loc important al sistemului imunitar al mucoasei, unde în principal funcțiile efectoare sunt menținerea barierei intestinale (Bailey, 2009). Spațiul bazolateral al celulelor epiteliale comunică cu *lamina propria* prin porii membranei bazale. Fluidul intercelular trece prin acești pori pentru a se amesteca cu cel din spațiile intercelulare și canalele intercelulare prelinfatice ale laminei proprii. De acolo, limfa intră în lacteele din vilozități sau în rețeaua de vase de sânge din interiorul *laminei propria* (Lowden și Heath, 1994).

Microtopografia laminei propria este caracterizată de un număr mare de celule prezentatoare de antigen, în special de celule dendritice și de multe elemente figurate ale sistemului vascular (Bimczok și col., 2005; Haverson și col., 2000). Biologia celulelor dendritice de porc este descrisă în articolul lui Summerfield și McCullough (Summerfield și McCullough, 2009). Agenții patogeni sunt ingerați de către DC epiteliale, care migrează ulterior în nodulii limfoizi din *lamina propria* sau către ganglionii limfatici mezenterici pentru activarea specifică a limfocitelor (Macpherson și Uhr, 2004). Celulele CPA au capacitatea de a face distincția între antigenele self și nonself prin intermediul receptorilor de recunoaștere a tiparelor (PRR), inclusiv receptorii de tip toll-like (TLR) (Fukata și Arditi, 2013). La

mamifere, TLRs sunt prezenți pe macrofage, neutrofile, DC celule dendritice, celule epiteliale intestinale și alte celule aparținând sistemului imunitar înăscut. TLRs recunosc molecule din structura microorganismelor sau modele moleculare derivate din agenții patogeni (PAMP) și semnale endogene din țesuturi lezionate și semnale de pericol induse de inflamație și necroză, inclusiv modelele moleculare asociate daunelor (DAMP) (Jialal și Kaur, 2012; Kawai și Akira, 2010). Liganzi microbieni exprimați de agenții patogeni, dar și de comensalii intestinali sunt cunoscuți ca MAMP-uri (model molecular asociat microbilor). Lipopolizaharide (LPS), peptidoglicanii, flagelina și peptidele formilate se numără printre aceste MAMP-uri recunoscute de TLR. În acest sens, celulele epiteliale intestinale exprimă o importantă moleculă de legare a LPS, clusterul de diferențiere 14 (CD14), care colaborează, împreună cu TLR-urile, la semnalizarea LPS și la activarea celulară (Funda și col., 2001).

În plus, celulele imunității înăscute produc alți factori critici, cum ar fi mieloperoxidaza (MPO), enzimă care joacă un rol esențial în diversele funcții ale neutrofilelor atât în imunitatea înăscută, cât și în cea adaptivă (Arnhold și Flemmig, 2010). Astfel, imunitatea înăscută este strâns legată de imunitatea adaptivă. În general, recunoașterea acestor MAMPs de către TLRs conduce la activarea căii de semnalizare a factorului nuclear-kappa B (NF- κ B) și, în consecință, induce producția de citokine proinflamatorii: factorului de necroză tumorală alfa (TNF- α), interleukina 1 (IL-1) și IL-6, precum și creșterea numărului de molecule co-stimulatoare pentru APC (celule prezentatoare de antigen), ceea ce duce la activarea celulelor adaptative (Purchiaroni și col., 2013). În acest sens, migrația celulelor imune de la situsurile inductive ale mucoaselor către țesuturile efectoare din întreagul sistem limfatic este baza răspunsului imun adaptativ în intestin (McGhee și Fujihashi, 2012).

Din categoria celulelor prezentatoare de antigen fac parte și mastocitele care reglează răspunsurile imune fiziologice și patologice (Frossi și col., 2010). Potrivit lui Van Nassauw și col., (2007), mastocitele au o poziție centrală în *lamina propria* intestinală formată din celule epiteliale, celule imune, vase sanguine, mușchiul neted și elementele nervoase situate intramural, deoarece sunt capabile să detecteze amenințări antigenice și să genereze sau să amplifice semnale către celelalte celule. După cum a descris Bischoff (2009), mastocitele reprezintă 2-3% din celulele *lamina propria* și sunt în general asociate cu boli alergice, deși au un număr mai mare de funcții fiziologice. Acestea reglează funcții precum controlul fluxului sanguin și al coagulării, contracția mușchilor netezi și peristaltismul, precum și secreția de acid, electroliți și mucus de către celulele epiteliale. În plus, ele dispun de

mecanisme de apărare care combină mecanismele înnăscute și răspunsurile imune adaptative împotriva agenților patogeni și, eventual, a florei comensale. Acestea recunosc microbii prin mecanisme dependente de anticorpi și prin intermediul mecanismelor de recunoaștere a modelelor receptori. În urma activării, ele secretă citokine, care atrag granulocite și limfocite la locul confruntării (Bischoff, 2009). Pe lângă un efect local, semnalele mastocitelor ajung, de asemenea, la ținte aflate la distanță. Recent, a fost demonstrat de către Kunder și col., (2009) că, în urma activării, mastocitele eliberează TNF α (factor de necroză tumorală alfa), o citokină implicată în inflamația sistemică prin modularea traficului de celule imune. Aceste particule intră în sistemul limfatic și se deplasează până la ganglion limfatic mezenteric. Acesta este un proces important, în care ganglionul limfatic suferă rapid modificări structurale semnificative, inclusiv proliferare rapidă, remodelare vasculară și o recrutare sporită de limfocite naive din circulație. Prin intermediul acestui proces, probabilitatea ca o celulă prezentatoare de antigen activată de la locul de pătrundere a agentului patogen întâlnește limfocite purtătoare ale unui receptor adecvat este mult crescută și, astfel are loc inițierea răspunsului imunitar adaptiv (Kunder și col., 2009).

2.2.3. Sistemul imunitar adaptativ

Al treilea nivel de apărare este sistemul imunitar adaptativ. Acesta reacționează destul de lent într-o infecție, dar recunoaștea și distrugerea invadatorii se face la un nivel avansat și cu memorie. Sistemul imunitar adaptativ generează un număr mare de receptori complet noi și unici pentru a detecta agenții patogeni. Celulele cu funcții imune adaptative importante sunt limfocitele T și limfocitele B. Multe dintre elementele sistemului imunitar menționate până acum au funcții în mai multe domenii și există diverse căi de interconectare (Tizard, 2017).

Răspunsurile imune adaptative ale mucoaselor rezultă din limfocitele T helper CD4⁺ (Th), incluzând atât celule CD4⁺ Th₂, cât și CD4⁺ Th₁, care induce dezvoltarea plasmocitelor (din limfocitele B) producătoare de IgA. Celulele Th sunt clasificate astfel în celule Th₁, care produc IL-2 și interferon- γ (IFN- γ) și sunt implicate în imunitatea celulară; celule Th₂, care produc IL-4, IL-5 și IL-6 și sunt implicate în imunitatea umorală și celulele Th₁₇, care produc citokine proinflamatorii, IL-17, și joacă roluri importante în inducerea inflamației (Mosmann și col., 1986; Peck și Mellins, 2010). Cu toate acestea, celulele T reglatoare (Treg) joacă roluri

centrale pentru imunoreglare, inhibând proliferarea și producția de citokine atât în ambele limfocite T CD4⁺ și CD8⁺ și producția de Ig de către celulele B (Sakaguchi și col., 2008).

După ce răspunsul imunitar este inițiat prin procesarea antigenului de CPA și prezentat către limfocitele B și T, acestea din urmă devin active părăsesc țesutul limfoid și migrează înapoi în mucoasă pentru a exercita funcții efectoare (Köhne și col., 1996). Orientarea limfocitelor care exprimă receptori specifici ajută la ghidarea intrării lor în cele din urmă în principalele țesuturi efectoare, cum ar fi *lamina propria*, prin intermediul vaselor limfatice de drenaj în ganglionii limfatici regionali și în fluxul sanguin (Campbell și Butcher, 2002; Iwata și col., 2004; Knoop și Newberry, 2012). Pentru a ajunge la destinație, aceste limfocite B și T folosesc molecule de adeziune speciale exprimate atât pe suprafața lor, cât și pe celulele endoteliale ale vaselor din *lamina propria* intestinală (Tizard, 2017).

Subseturile de celule T efectoare preferă locații diferite în cadrul mucoasei. Limfocitele Tαβ de porc se găsesc în principal în țesuturile limfoide și în *lamina propria* a vilozităților și a criptelor, în timp ce limfocitele Tγδ sunt localizate predominant în epiteliul intestinal. Aceste limfocite intraepiteliale sunt o populație eterogenă de celule cu o gamă diversă de funcții în supravegherea epitelială. Ele pot prezenta antigene, pot regla răspunsurile IgA ale celulelor B, au proprietăți de celule natural killer, sunt celule T citotoxice sau participă la repararea epiteliilor deteriorate și, prin urmare, reprezintă un element important în homeostazia mucoaselor și în funcția de barieră (Charerntantanakul și Roth, 2006; Tizard, 2017).

Limfocitele intraepiteliale sunt limfocite care imigrează în epiteliul intestinal după naștere iar la vârsta de două luni, numărul de celule este comparabil cu cel al porcilor adulți. Există metode de separare specifice pentru limfocitele intraepiteliale intestinale și limfocitele din *lamina propria* (Bailey și col., 1994; Solano-Aguilar și col., 2000; Bondar și col., 2022), ceea ce face posibilă cuantificarea numărului de celule din peretele intestinal (Rothkötter și col., 1991). În jejunum și ileon, acestea variază între 20 și 30 de limfocite intraepiteliale la 100 de enterocite. Purceii fără germeni au un număr redus de limfocite intraepiteliale (în funcție de vârstă, mai puțin de 5/100 enterocite), demonstrând importanța interacțiunii sistemului imunitar cu microbii luminali (Rothkötter și col., 1990).

Unele limfocite activate nu migrează neapărat înapoi către mucoasa intestinală. Celule B producătoare de IgA pot migra în ganglionii limfatici regionali, pot intra în circulație și se pot stabili de exemplu, la nivelul glandelor mamare care asigură o secreție lactată ce

conține anticorpi IgA împotriva agenților patogeni intestinali. Peretele intestinal conține majoritatea plasmocitelor secretoare de IgA din organism (Pabst și Rothkötter, 2006), iar intestinul la porci este sursa principală a IgA prezente în plasma sanguină porcină (Vaerman și col., 1997). Atunci când calea este activată, celulele epiteliale produc componenta secretorie (pIgR) (Brandtzaeg, 2010) care se leagă de pIgA în *lamina propria*. Complexul nou format este internalizat și transportat prin transcitoză spre polul apical al celulelor epiteliale, dând naștere la anticorpi IgA secretori cu specificități pentru diferiți antigeni întâlniți în situsurile inductive ale mucoaselor (Brandtzaeg, 2010; Fujihashi și col., 2008).

În ciuda panopliei de substanțe antigenice din lumen, există un control echilibrat fără a induce vreo patologie evidentă. Cu toate acestea, perturbări ale homeostaziei imune și ale mecanismelor care o controlează, inclusiv complexele multiproteice joncționale sau microbiota comensală, ar putea duce la disfuncții intestinale (Camilleri și col., 2012; Purchiaroni și col., 2013). În acest sens, sistemul imunitar intestinal răspunde la substanțe exogene, inclusiv la semnalele moleculare derivate din alimente și la semnalele patogene. Prin urmare, o înțelegere a căilor specifice care participă la detectarea și gestionarea semnalelor periferice este esențială pentru a determina corect strategia pentru menținerea homeostaziei intestinale.

3. UTILIZAREA POLIFENOLILOR DIN STRUGURI CA ANTIOXIDANȚI NATURALI ÎN HRANA PORCILOR

USE OF GRAPE POLYPHENOLS AS NATURAL ANTIOXIDANTS IN PIG DIETS

3.1. Producția de struguri

Strugurele (*Vitis spp.*) este una dintre cele mai importante specii de plante din punct de vedere agronomic, zootehnic și economic datorită diverselor sale utilizări în producția de vin, dar și ca alte subproduse alimentare. Utilizarea strugurilor are o istorie îndelungată, datând din antichitate și fiind răspândită în lumea modernă, în special prin industria vinului. Strugurii se numără printre cele mai răspândite culturi pomicole din lume, cu o producție anuală de aproximativ 74 de milioane de tone. Din această cantitate, 37,5% sunt cultivate în Europa, 36,5% în Asia și 17,2% în Statele Unite (FAO-OIV, 2022) Strugurii sunt cultivați pe toate continentele în regiunile temperate, caracterizate de precipitații abundente, veri calde și uscate și ierni blânde (Vivier și Pretorius, 2000). Aproximativ 50% din producția de struguri este utilizată pentru producerea vinului, o treime pentru consumul ca fructe proaspete, iar restul sunt prelucrați în produse alimentare precum suc, stafide, extract și ulei din semințe de struguri, și oțet (FAO-OIV, 2022). Din acest motiv, există numeroase studii bibliografice care analizează și caracterizează strugurii, vinul și derivații din struguri, cum ar fi tescovina (Cotoras și col., 2014; Ky și col., 2014).

Producția de *Vitis vinifera sativa* este de mare relevanță datorită valorii nutriționale și proprietăților farmaceutice ale boabelor de struguri, atât crude cât și uscate, precum și ale derivaților acestora, cum ar fi extractele și uleiul din semințe de struguri (Bail și col., 2008; Beres și col., 2017). Strugurii se numără printre fructele cele mai bogate în carbohidrați (17 g/100 g), au un conținut caloric ridicat (65 kcal/100 g) și un indice glicemic relativ scăzut unusan2020. Boabele de struguri reprezintă aproximativ 20-25% din greutatea totală a strugurilor utilizați pentru producția de vin (Yu și Ahmedna, 2013). Strugurii sunt o sursă excepțională de mangan și potasiu și conțin, de asemenea, vitaminele B6, C, și tiamină. Sunt printre cele mai bogate surse de polifenoli, localizați în special în pielea strugurilor (Brenes

și col., 2016). Boabele de struguri conțin fibre, proteine, lipide și minerale. Proteinele (12% în greutate uscată) conțin aminoacizi esențiali precum arginina (7,2%), acidul aspartic (7,1%), acidul glutamic (11,5%), glicina (6,2%) și treonina (21,7%). Lizina, un aminoacid esențial și limitator în dieta porcinelor, este prezentă în cantități considerabile (în medie 4,5% din totalul aminoacizilor), în contrast cu metionina, care este prezentă până la 1,4% (Costa și col., 2022).

3.2. Subprodusele din struguri ce pot fi introduse în hrana animalelor

Subprodusele derivate din fructe sunt generate pe scară largă în întreaga lume, iar sectorul agroindustrial al strugurilor are o importanță economică majoră (Erinle și Adewole, 2022). Industria mondială a vinului produce mii de tone de reziduuri anual, creând o mare provocare pentru gestionarea deșeurilor (Skuras și Psaltopoulos, 2012). Aceste reziduuri solide includ diverse subproduse, cum ar fi lăstarii de viță-de-vie, tulpinile, pielițele, semințele, drojdia, turtele de filtrare și tescovina (Costa și col., 2022).

Până de curând, tescovina de struguri era considerată un deșeu industrial și era lăsată să se descompună pe câmpurile vinărilor din apropiere sau în depozite masive de deșeuri (Lu și Foo, 1999). Se estimează că tescovina de struguri reprezintă aproximativ 20% din greutatea totală a strugurilor folosiți pentru fabricarea vinului (Brenes și col., 2016). După prelucrarea vinului, boabele de struguri pot fi împărțite în două fracțiuni: tescovină fără sâmburi (pulpă reziduală, peduncul și pielită) și tescovină cu semințe. Prima fracțiune este bogată în fibre alimentare, în timp ce semințele sunt valorizate în principal pentru uleiul lor, care conține acizi grași nesaturați, cum ar fi acidul oleic și acidul linoleic (Costa și col., 2022). Semințele și pielita reprezintă 38-52% și, respectiv, 5-10% din tescovină, pe bază de substanță uscată (Brenes și col., 2016, p. 20).

Semințele de struguri sunt compuse din fibre (47%, dintre care 60-70% sunt nedigerabile), carbohidrați complecși (29%), grăsimi (13%, bogate în acizi grași esențiali), proteine (11%), minerale și compuși fenolici extractibili, cum ar fi acizii fenolici și flavonoidele (de exemplu, acidul protocatechuic și epicatechina) (Bail și col., 2008; Gungor și col., 2021). Proteinele din semințele de struguri conțin toți aminoacizii esențiali, având o medie de 4,5% pentru lizină și 3,5% pentru metionină. Cei mai predominanți aminoacizi sunt

aceiași ca în cazul boabelor de struguri, cu excepția treoninei, care este prezentă în proporție de 4,0% (Costa și col., 2022).

Extractul din sâmburi de struguri și uleiul din sâmburi de struguri sunt două subproduse obținute din semințele de struguri după prelucrarea vinului sau a sucului de struguri. Semințele sunt extrase, uscate și purificate pentru a obține aceste subproduse derivate, cum ar fi extractul din sâmburi de struguri, care conține o concentrație ridicată de polifenoli și ulei din sâmburi de struguri, care este bogat în acizi grași esențiali (Lau și King, 2003). Aceste substanțe sunt cunoscute pentru puternicul lor efect antioxidant, care împiedică reacțiile oxidative dăunătoare și îndepărtează radicalii liberi din organism (Felhi și col., 2016; Yilmaz și Toledo, 2004), precum și pentru proprietățile lor antimicrobiene (Gungor și col., 2021).

Valoarea potențială a subproduselor de struguri în alimentația animalelor depinde în principal de proprietățile lor nutritive, cum ar fi digestibilitatea fibrelor, a proteinelor și a materiei organice, valoarea energetică, precum și de efectele biologice active. Subprodusele de struguri sunt deosebit de bogate într-o gamă largă de polifenoli. Anterior cunoscuți sub numele de taninuri, acești polifenoli au fost considerați factori antinutriționali, deoarece prezența lor în anumite leguminoase avea efecte negative asupra nutriției animalelor (Brenes și col., 2016). Limitările majore ale utilizării tescovinei în hrana monogastricilor sunt datorate peretelui celular lignificat și conținutului ridicat de taninuri. Cele mai mari proporții de fibre alimentare (74% în greutate), compuse în principal din hemiceluloze și acoperite de o pată albicioasă (un praf de drojdii sălbatice și bacterii) (Igartuburu și col., 1998), și de polifenoli (taninuri) (Nardoia și col., 2020) se găsesc în pielea strugurilor și semințe. Cu toate acestea, tulpina strugurilor este lemnoasă și este compusă în întregime din taninuri, conținând mai mult de 50% din totalul polizaharidelor și, astfel, reprezentând o sursă atractivă din punct de vedere economic de material fibros (Prozil și col., 2012). Studiile efectuate in vivo și in vitro în ultimii ani au demonstrat efectele benefice ale administrării acestor substanțe bioactive. De fapt, fibrele alimentare cresc peristaltismul intestinal și acționează ca un tampon și un prebiotic care stimulează dezvoltarea bacteriilor benefice în tractul digestiv (Erinle și Adewole, 2022), în timp ce polifenolii pot acționa ca antioxidanți, antimicrobieni și imunomodulatori (Alonso și col., 2002; Erinle și Adewole, 2022; Fang și col., 2020; Gungor și col., 2021; Hao și col., 2015; Torres și col., 2002; Viveros și col., 2011; X.-H. Wang și col., 2020). În funcție de doză și de tratamentul subproduselor de struguri incluse în hrana

animalelor, fibrele alimentare și compușii polifenolici pot menține sau îmbunătăți performanțele de creștere și sănătatea porcilor (Fang și col., 2020, p. 20200; Hao și col., 2015; X.-H. Wang și col., 2020).

3.3. Structura chimică a polifenolilor din struguri

Compoziția chimică a subproduselor din struguri depinde de o serie de factori, printre care maturitatea, soiul de struguri, tipul de sol, condițiile meteorologice, localizarea geografică (Chedea și col., 2021; Iuga și Mironeasa, 2020) și tehnologia de vinificare utilizată (de la Cerda-Carrasco și col., 2015; Erinle și Adewole, 2022; Muncaciu și col., 2017). Toate aceste aspecte pot modifica calitățile fizice ale strugurilor, inclusiv gustul, aroma, textura și aspectul lor (Chedea și col., 2021). Polifenolii sunt compuși cu una sau mai multe grupe hidroxil fenolice legate de unul sau mai multe inele benzenice (Vermerris și col., 2006). Ei sunt împărțiți în clase pe baza numărului de grupe fenolice conținute și a elementelor structurale atașate acestor inele benzenice (Ozcan și col., 2014). Biosinteza acestor componente în plante a făcut obiectul multor cercetări (Dixon și col., 2005; Hrazdina, 1992; Winkel-Shirley, 2001). Înțelegerea biosintezei componentelor fenolice este esențială pentru gestionarea eficientă a producției lor în plante și, prin urmare, a subproduselor care pot fi utilizate în hrana porcilor. Înțelegerea biosintezei compușilor fenolici este esențială pentru gestionarea eficientă a producției acestora în plante și, implicit, în subprodusele care rezultă și care pot fi utilizate în hrana porcilor. Identificarea compușilor fenolici în struguri a început la sfârșitul secolului al XIX-lea și continuă și astăzi. În general, polifenolii pot fi împărțiți în aproximativ 10 clase cu structuri de bază diferite conform lui Bravo et al. 1998 (Bravo, 1998). În cadrul sâmburilor de struguri, polifenolii pot fi împărțiți în două categorii majore: flavonoide și non-flavonoide. Flavonoidele din sâmburii de struguri sunt împărțite în flavanoli, flavonoli, proantocianidine, antociani și antocianidine, în timp ce non-flavonoidele includ acizii fenolici și stilbenele (Brenes și col., 2016; Durazzo și col., 2019; Erinle și Adewole, 2022).

Flavonoidele sunt cei mai puternici fitonutrienți din punct de vedere biologic din cadrul polifenolilor din struguri. Aceștia pot fi împărțiți în mai mult de 13 subclase cu mai mult de 6000 de structuri chimice diferite (Hichri și col., 2011; Lim și AG Koffas, 2010;

Scalbert și col., 2002). Conform studiilor realizate de Bravo și col., Motohashi și col., (2008) și Aron și Kennedy (2008), structura de bază a flavonoidelor este formată din doi radicali fenil (inelele A și B) uniți prin trei atomi de carbon pentru a crea un heterociclu conținând oxigen (inelul C). Flavonoidele sunt clasificate în continuare în funcție de starea lor de oxidare și de distribuția radicalilor hidroxil pe inelul heterociclic (Ozcan și col., 2014; Singla și col., 2019). Diversitatea structurilor chimice ale flavonoidelor este responsabilă de gama largă de activități fiziologice și biologice ale acestora. Majoritatea flavonoidelor sunt conținute în celulele epidermice ale pielii strugurilor, în timp ce aproximativ 60-70% din totalul polifenolilor se găsesc în semințe (Ali și col., 2010; Nassiri-Asl și Hosseinzadeh, 2009; Tsao, 2010). Flavonoidele reprezintă principala clasă de compuși fenolici solubili care se găsesc în struguri și sunt principalii factori care contribuie la activitatea biologică a produselor din struguri (Conde și col., 2007). Bioactivitățile flavonoidelor sunt influențate în mod semnificativ de gradul de glicozilare, de tipul de radical de zahăr prezent și de esterificarea acidă ulterioară (Cho și col., 2004, p. 200). Prin urmare, selectarea diferitelor soiuri cu profiluri flavonoide distincte poate avea efecte asupra sănătății porcilor. Flavonoidele sunt renumite pentru proprietățile lor cardioprotectoare, neuroprotectoare, antimicrobiene, anti-îmbătrânire (Heim și col., 2002; Narayana și col., 2001; Xia și col., 2010), antidiareice (Song și col., 2011), antibiotice (Mayer și col., 2008), antiinflamatoare (Goodrich și col., 2012; Wang și col., 2013) și antioxidante (Bagchi și col., 2000; Dai și Mumper, 2010). De asemenea, acestea ajută la îmbunătățirea vederii (Yamakoshi și col., 2002) și la cardioprotecție (Sato și col., 2001), printre alte beneficii (Shi și col., 2003). În plus, acestea oferă protecție UV, definesc culoarea florilor, ajută la atragerea polenizatorilor și protejează țesuturile de invazia agenților patogeni sau de deteriorarea cauzată de stresul oxidativ (Harborne și Williams, 2000).

Cele mai frecvente flavonoide din struguri sunt flavanolii, inclusiv monomerii, cum ar fi catechina și epicatechina, proantocianidinele oligomerice (2 până la 5 unități) și polifenolii polimerici (mai mult de cinci unități), care sunt cunoscuți ca taninuri condensate (Crozier, 2003; Zhao și col., 2010). Structura flavanolilor include un radical hidroxi în atomul C3 și un inel B legat de atomul C2 (Panche și col., 2016; Santhakumar și col., 2018; Singla și col., 2019). Flavanolii sunt sintetizați înainte de înflorire, iar concentrația lor crește până la veraison - momentul coacerii strugurilor (Verries și col., 2008). Principalii monomeri de flavan-3-oli din struguri și vin includ (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-galat (Su

și Singleton, 1969) și (-)-epigallocatechin, precum și urme de (+)-gallocatechin. În pielițele și tulpinile strugurilor, principalii monomeri sunt (+)-catechina, (-)-epicatechina și (-)-epicatechina 3-O-galat, în timp ce semințele conțin catechina, epicatechina 3-O-galat și epicatechina (Cantos și col., 2002; Souquet și col., 2000). Conținutul de (-)-epicatechină și (+)-catechină este mai mare în soiurile roșii decât în cele albe (Gođevac și col., 2010). Catechina este cel mai abundent flavanol găsit în semințe și în pielița strugurilor, cu urme și în pulpa strugurilor (Brenes și col., 2016). Acești compuși contribuie la amăreala vinului și pot provoca o oarecare astringență. Studiile inițiale asupra acestor compuși au început în anii 1920 (Freudenberg și Blümmel, 1924) și au fost explorate în continuare în semințele de struguri și în timpul producției de vin. O proporție semnificativă de monomeri de flavan 3-ol provine din semințele de struguri (Czochanska și col., 1980; Meyer și Hernandez, 1970; Oszmianski și col., 1986; Romeyer și col., 1985; Singleton și col., 1966), cu temperaturi mai ridicate, concentrații mai mari de alcool și timpi de extracție mai lungi care cresc concentrația lor în vin. Flavanolii nu sunt glicozilați în alimente, spre deosebire de alte clase de flavonoide (Brenes și col., 2016).

Proantocianidinele (taninuri condensate) sunt alcătuite din două până la cinci subunități flavan-3-ol. Se numesc proantocianidine oligomerice deoarece scindarea catalizată de acid a lanțurilor polimerice produce antocianidine. Flavan-3-olii se caracterizează prin prezența grupării hidroxil (-OH) în poziția 3 a structurii de bază a flavonoidelor. Chimia taninurilor variază în funcție de originea lor, conținând până la douăzeci de radicali hidroxil și o masă moleculară de 500 Da până la 3000 Da (Khanbabaee și Van Ree, 2001). Variațiile structurale între proantocianidine depind în principal de legăturile interflavanice, subclasificate în tipul A (legături C2-O-C5 sau C2-O-C7) și tipul B (legături C4-C6 sau C4-C8) (Aron și Kennedy, 2008). Procianidina C1 este un trimer cu legături C4-C8 (Bogs și col., 2005; Goodrich și col., 2012; Tsang și col., 2005).

Diferența în pozițiile legăturilor interflavonoide și în unitățile constitutive conferă diversitate structurală oligomerilor superiori, crescând numărul de izomeri cu un grad de polimerizare (Czochanska și col., 1980; Edwin, 1980; Foo și Porter, 1981, 1980). Cunoștințele limitate despre chimia proantocianidinelor se datorează metodelor analitice care se concentrează pe fiecare oligomer ca o clasă, fără a identifica proantocianidinele din cadrul fiecărei clase (Lin și col., 2014). Proantocianidinele oligomerice galoilate sunt caracteristice polifenolilor condensați din semințe de struguri (Geny și col., 2003). Capacitatea taninurilor

de a lega proteinele stă la baza caracteristicilor lor protectoare (Constabel și col., 2014) și a beneficiilor lor nutriționale (Li și Hagerman, 2013). Acestea au un miros specific și un gust astringent și se prezintă sub forma unei pulberi albe sau galbene, libere sau lucioase (Prior și Gu, 2005; Smeriglio și col., 2017). Strugurii și vinul au unul dintre cele mai ridicate niveluri fenolice dintre fructe, legume și băuturi. În funcție de soi, conținutul de proantocianidine la momentul recoltării poate varia de la 0,5 la aproximativ 6,4 mg/g din greutatea fructului proaspăt de boabe (Terrier și col., 2009). Proantocianidinele contribuie la astringența vinurilor roșii, fiind extrase din semințe, aburi și pielită (Yu și Ahmedna, 2013). Aproximativ 30% din proantocianidine se află în semințe, iar 15% în coajă (Hanlin și col., 2011). Extracția din semințe necesită ruperea pereților celulari (Pinelo și col., 2006). Conținutul final de proantocianidine din semințe se obține într-un stadiu mai târziu decât cel din coajă, la câteva săptămâni după debutul maturării. Aceste componente au fost printre cei mai recent identificați structural compuși fenolici importanți (Creasy și Swain, 1965; Weinges și col., 1968). Proantocianidinele cu o greutate moleculară mică se găsesc în concentrații foarte scăzute și sunt ușor hidrolizate (Serrano și col., 2009), în timp ce cele cu greutate moleculară mai mare sunt asociate cu proprietăți astringente și de protecție UV. Acești compuși sunt populari în formulările alimentare funcționale pentru beneficiile lor pentru sănătate (Martinez-Micaelo și col., 2012; Pinent și col., 2016; Salvadó și col., 2015). Conținutul de proantocianidine este influențat de condițiile climatice și geografice, de soiul de struguri, de fertilizare, de practicile de cultivare și de sol (Godevac și col., 2010).

Antocianinele, cu inelul B aromatic atașat în poziția C2, au două legături în inelul heterociclic. Ele constituie versiunea glicozilată a antocianidinelor (agliconă), care rezultă din legarea grupei hidroxil C3 cu fracțiunea de zahăr. Antocianinele sunt polifenolii cei mai răspândiți în pielita strugurilor roșii și acționează ca coloranți naturali (de la Cerda-Carrasco și col., 2015; Durazzo și col., 2019; Jin et și col., 2019; Panche și col., 2016; Santhakumar și col., 2018; Singla și col., 2019). Ele se găsesc mai ales în pielită, dar în anumite soiuri „teinturier” (sau colorate), pigmentii antocianici se acumulează și în pulpa boabelor (He și col., 2010; Montealegre și col., 2006). Există o relație strânsă între nivelurile de biosinteză a antocianilor și dezvoltarea boabelor, care începe la „veraison”, când biosinteza proantocianidinelor este completă, și atinge punctul maxim la maturitate (Zhang și col., 2013). Există un set unic de antociani în fiecare specie și varietate de struguri (Zhu și col., 2012). De exemplu, strugurii europeni produc în principal antocianidine 3-O-monoglucoside, în timp ce

strugurii muscadine produc în principal antocianidine 3,5-O-diglucoside. Identificarea structurii antocianinelor a fost precedată de cercetări științifice privind culoarea vinului roșu (Pasteur, 1873).

Structura generală a antocianilor a fost determinată la începutul secolului XX (Levy și col., 1931; Willstätter și Everest, 1913). Structurile principalelor antociani din strugurii *Vitis vinifera* au fost identificate în 1959, malvidina-3-O-glucosid fiind principalul antocian prezent, împreună cu formele sale acilate (Ribéreau-Gayon, 1959). Lucrările lui Ribéreau-Gayon au demonstrat, de asemenea, că antocianinele din *Vitis vinifera* sunt structural distincte de cele găsite la alte specii, fiind exclusiv monoglucozide, în timp ce speciile non-vinifera conțin și 3,5-diglucozide. Studiile ulterioare privind distribuția și structura antocianilor în speciile de struguri au aprofundat înțelegerea antocianilor din struguri (Fong și col., 1971; Puissant și Léon, 1967; Rankine și col., 1958).

Spre deosebire de flavonoide, polifenolii non-flavonoizi au un singur inel ca structură principală. Moleculele non-flavonoide găsite în struguri includ stilbenele și acizii fenolici (Mendonça și col., 2022; Ozcan și col., 2014; Singla și col., 2019). Acizii fenolici din struguri sunt derivați ai acizilor hidroxicinamici, precum acizii cafeic, p-coumaric, ferulic și sinapic, și ai acizilor hidroxibenzoici, precum acizii gentisic, galic, protocatechuic, p-hidroxibenzoic și siringic (Ali și col., 2010; Kammerer și col., 2004; Ozcan și col., 2014; Singla și col., 2019). Acești acizi fenolici, în special acizii hidroxicinamici sub formă de ester al acidului tartric, sunt principalele componente fenolice ale vinului alb și sunt esențiali pentru culoarea acestuia. Ei provin în principal din pulpa de struguri, dar se găsesc în cantități similare și în vinurile roșii. La mijlocul secolului al XX-lea, acizii hidroxicinamici au fost identificați în struguri (Ribéreau-Gayon, 1959). Acești compuși au fost observați anterior ca fiind sub formă de acizi liberi. Ulterior, s-a descoperit că strugurii nu conțin acizi hidroxicinamici liberi, dar au acid tartric esterificat. Alți compuși au fost caracterizați (Baranowski și Nagel, 1983; Cheynier și col., 1986) și prezentați în boabe înainte de coacere.. Stilbenele constau din două inele aromatice legate de un radicular etilenic. Cel mai cunoscut stilben este resveratrolul. Stilbenele se găsesc în struguri, vin și derivatele lor (Mendonça și col., 2022; Ozcan și col., 2014; Singla și col., 2019).

3.4. Biodisponibilitatea polifenolilor la nivele intestinal

Biodisponibilitatea este o măsură a cantității din structura naturală a unui aliment care este disponibilă pentru destinația sa după ce a fost ingerată prin tractul gastrointestinal. Cantitatea unui compus care este absorbită, metabolizată și circulă în organism se numește biodisponibilă (Carbonell-Capella și col., 2014). Metabolismul digestiv, bioactivitatea, repartiția tisulară, metabolismul hepatic și intestinal și absorbția de către celulele epiteliale intestinale sunt denumite biodisponibilitate (Courraud și col., 2013). Astfel, biodisponibilitatea se bazează riguros pe activitățile de biodisponibilitate (Palafox-Carlos și col., 2011). Biodisponibilitatea și livrarea eficientă a polifenolilor la țesuturile țintă sunt necesare pentru a explica efectele biologice ale polifenolilor. Prin urmare, este important să se înțeleagă modul în care aceștia sunt absorbiți, metabolizați și excretați din organism

Studiile de absorbție sunt complicate de complexitatea moleculară a extractelor sau alimentelor bogate în polifenoli datorită unor factori precum gradul de conjugare și polimerizare cu alți fenoli. Majoritatea polifenolilor sunt disponibili în plante sub formă de esteri, polimeri sau glicozide, care nu pot fi absorbiți în structura lor originală. Majoritatea polifenolilor sunt legați de componente ale peretelui celular precum proteinele, arabinoxilanii sau alți compuși organici precum lipidele și acizii (Andreasen și col., 2001; Bunzel și col., 2004). Înainte de a putea fi absorbiți, aceștia trebuie hidrolizați de microbiotă sau de enzime endogene. După absorbție, polifenolii sunt recunoscuți de organism ca substanțe străine, rezultând o biodisponibilitate relativ scăzută în comparație cu macro- și micronutrienții.

Metabolismul polifenolilor implică o serie de reacții comune menite să reducă potențialul lor citotoxic prin creșterea hidrofilicității și favorizarea excreției biliare sau urinare (Manach și col., 2004). Structura chimică a polifenolilor, mai degrabă decât concentrațiile acestora, este cea care definește viteza și amploarea absorbției, precum și caracteristicile metaboliților circulanți în plasmă. Conform estimărilor făcute de Faria și col., (2014) și Corrêa și col., (2019), absorbția polifenolilor din substanțele vegetale în intestinul subțire este mai mică de 5-10%.

În funcție de complexitatea lor și de gradul de polimerizare, absorbția polifenolilor poate varia. Polifenolii cu o structură simplă (monomerici și dimerici) sunt ușor absorbiți în intestinul subțire, în timp ce polifenolii oligomerici și polimerici ajung în colon aproape neschimbați (Cermak și col., 2003; Manach și col., 2004; Monagas și col., 2010; Zubik și

Meydani, 2003). Studiile anterioare au arătat că trimerii și dimerii de procianidină sunt foarte stabili în condiții de digestie gastrică și duodenală, iar consumul de dimeri este considerat a fi de aproximativ 100 de ori mai mic decât cel de monomeri (Kumar și Pandey, 2013). În plus, s-a observat că proantocianidinele din coji tind să aibă un grad mai mare de polimerizare decât cele obținute din semințe (Eriz și col., 2011). Cu toate acestea, cercetări recente sugerează că numai polimerii cu grade de polimerizare mai mici de 5 sunt absorbiți (Ou și Gu, 2014) sau sunt ulterior degradați la monomerii lor flavan-3-ol în lumenul intestinal. Cu toate acestea, majoritatea polifenolilor ajung în colon în stare intactă, unde mențin integritatea barierei intestinale și își exercită efectele bioactive, inclusiv antiinflamatorii și antioxidante (Beșchea-Chiriac și Solcan, 2024). Pe lângă aceasta, o parte din metaboliți poate avea un efect prebiotic, promovând creșterea bacteriilor benefice și inhibând creșterea bacteriilor patogene din microbiota intestinală (Axling și col., 2012; China și col., 2012; Etxeberria și col., 2015; Moreno-Indias și col., 2016; Queipo-Ortuño și col., 2012). Astfel, microbiota intestinală joacă un rol esențial în descompunerea polifenolilor și în producerea metaboliților responsabili de efectele biologice asociate consumului de polifenoli.

3.5. Bioefectele polifenolilor în producția porcină

Strugurii și subprodusele din struguri sunt surse bogate de compuși nutriționali, cum ar fi fibre, proteine, minerale, vitamine și antioxidanți. Datorită conținutului lor de compuși bioactivi (Brenes și col., 2016), ele sunt potrivite pentru a fi utilizate ca ingrediente funcționale în alimentația porcilor (Spigno și col., 2017). În plus, aceste subproduse pot servi drept agenți antimicrobieni, reducând astfel necesitatea utilizării antibioticelor (Erinle și Adewole, 2022). O caracteristică de bază a substanțelor fenolice este activitatea lor antioxidantă semnificativă. În plus, anumiți polifenoli pot avea beneficii suplimentare, cum ar fi îmbunătățirea imunității, proprietăți antiinflamatoare, promovarea sănătății intestinale și activitatea antimicrobiană (Mahfuz și col., 2021).

Bioefectele polifenolilor din struguri în creșterea și producția porcilor

Tabel 3.1.

Bioeffects of grape polyphenols in pig husbandry

Table 3.1.

Mod de administrare	Efect	Sursă
1% GSGME timp de 4 săptămâni Porci în vârstă de 6 săptămâni cu 12 kg	✓ Inhibă inflamația în mucoasa duodenală a porcilor prin suprimarea activității NF-κB ✓ Reducerea transactivării lui Nrf2 și a expresiei genice a mai multor gene țintă Nrf2 în duodenum ✓ O îmbunătățire a raportul câștig/alimente. ✓ O creștere a raportului înălțime vilozități:adâncime cripte în intestinul subțire ✓ Nici un efect asupra ADFI, a greutateii corporale finale și a ADG ✓ Scădere a FCR	Gessner și col., 2013
1% (GSGME) pentru 28 de zile Porci de 5 săptămâni cu 10 kg	✓ Îmbunătățirea raportului hrană-câștig la porcii înțărcați. ✓ Modificarea microbiotei intestinale și efect antiinflamator. ✓ Morfologia intestinală nu a fost modificată ✓ Nici un efect asupra ADFI, a greutateii corporale finale și a ADG ✓ Scădere a FCR	Fiesel și col., 2014
GSE (polifenoli cu greutate moleculară mică) 10 g/kg pentru 6 zile	✓ Reducerea diareei induse de <i>E. coli</i> la porcii înțărcați.	Verhelst și col., 2014
Extract care conține polifenoli inclusiv GSE (semințe de struguri) 1 g/kg pentru 3 săptămâni	✓ Nu există diferențe în ceea ce privește numărul de microbi în fecale și cecum la porcii înțărcați. ✓ Valori reduse ale TBARS din plasmă. Diminuarea producției de MDA ✓ Nu a afectat performanțele de creștere	Zhang și col., 2014
0,5, 1 și 1,5% procianidine din semințe de struguri (GSP) timp de 28 de zile Purcei de 21 de zile cu greutatea de aproximativ 7 kg	✓ A crescut semnificativ activitățile serice SOD și GSH-Px, nivelul seric al TAOC și a scăzut remarcabil conținutul de MDA. ✓ A îmbunătățit răspunsurile imune umorale și celulare ale purceilor înțărcați prin modularea producției de anticorpi, complemenți și citokine (IgG, IgM, C-4, IL-2). ✓ A crescut capacitatea antioxidantă, a sporit imunitate și a redus incidențadiareei. ✓ Nu a afectat în mod semnificativ performanța de creștere. Nici un efect asupra ADG, ADFI și FCR	Hao și col., 2015
5% tescovină de struguri (GP) pentru 36 de zile Purcei de 10,7 kg	✓ A crescut statusul antioxidant total (TAS) și a scăzut peroxidarea lipidelor (TBARS) atât în duoden, cât și în colon, și a crescut activitatea SOD în duoden și activitatea CAT și GPx în colon. ✓ Creșterea ADFI și niciun efect asupra ADG și FCR.	Chedea și col., 2018
1% extract de semințe de struguri	✓ A provocat o schimbare ecologică în microbiom, crescând dramatic <i>Lachnospiraceae</i>, <i>Clostridiales</i>, <i>Lactobacillus</i> și <i>Ruminococcaceae</i> în fecale.	Choy și col., 2014

(GSE) în dieta, timp de 6 zile Porci femele de rasă încrucișată		
8% semințe de struguri (GS) incluse în dietă	✓ A indus o scădere semnificativă a <i>Lactobacillus</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Bacteroidales</i> și <i>Campylobacter</i> , în timp ce a avut un impact pozitiv asupra altor specii precum <i>Megasphaera</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Anaerovibrio</i> sau <i>Prevotella</i> .	Grosu și col., 2019
250 mg/kg (GSPs) proantocianidine din semințe de struguri timp de 28 de zile Purci înfărcați	✓ A semnificative ale ADFI. ✓ A îmbunătățit funcția de barieră și morfologia mucoasei intestinale ✓ Proantocianidinele din dietă au îmbunătățit diversitatea microbiană în digesta ileală și colonică. A diminuat abundența <i>Lactobacillaceae</i> și a crescut abundența <i>Clostridiaceae</i> atât în lumenul ileal, cât și în cel colonic.	Han și col., 2016
9% tescovină de struguri (GP) timp de 30 de zile Purci de 20 de zile cu greutatea de 4,8 kg	✓ A îmbunătățit mecanismele antioxidante, a prevenit deteriorarea lipidelor și proteinelor cauzate de stresul oxidativ și a îmbunătățit funcția și sănătatea barierei intestinale ✓ Mai multe bacterii lactice și <i>Bifidobacterii</i> , mai puține <i>Enterobacteriaceae</i> și <i>Campylobacter jejuni</i> în fecale ✓ A îmbunătățit performanțele de creștere prin creșterea greutateii corporale și a arătat un efect benefic semnificativ asupra calității cărnii	Kafantaris și col., 2018
50-100-150 mg/kg Procyanidine din semințe de struguri (GSP) La purci înfărcați, timp de 28 de zile	✓ A favorizat activitatea enzimelor de la marginea epitelului prismatic cu platou striat, a crescut concentrațiile serice de glucoză și de proteine totale și a scăzut permeabilitatea epitelială	Li și col., 2020
8 % făină de semințe de struguri timp de 30 zile purci de 21 de zile cu o greutate corporală medie de 9,04 ± 0,13 kg.	✓ A redus inflamația la nivel intestinal	Pistol și col., 2020
5% turtă de semințe de struguri timp de 24 de zile Porci la finisare cu 75,5 kg	✓ A generat un nivel mai scăzut al citokinelor inflamatorii (expresie genetică și secreție de proteine) în ficat ✓ Statusul antioxidant nu a fost influențat ✓ Nu a avut niciun efect asupra ADG și ADFI ✓ A scăzut semnificativ concentrația de colesterol și a crescut nivelul de IgA în plasmă ✓ TBARS a fost redus semnificativ.	Taranu și col., 2018
5% tescovină de struguri timp de 28 de zile Purci de 28 de zile	✓ Nici un efect asupra ADG, ADFI și FCR ✓ Număr mai mare de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Olsenella umbonata</i> și <i>Selenomonas bovis</i> în cecum ✓ Înălțime mai mare a vilozităților și raport înălțime vilozități/adâncime cripte mai mare a jejunului ✓ Expresia scăzută pentru MRNA și citokinele proinflamatorii (IL-1β, IL-8, IL-6 și TNF-α) ✓ Un nivel mai ridicat de IgG în ser	Wang și col., 2020

0,04% extract de semințe de struguri pentru 28 zile Purcei cu greutatea de 8,4 kg	✓ A crescut ADG și a scăzut FCR	Fang și col., 2020
0,015% extract de semințe de struguri timp de 56 de zile Purcei (sex mixt) cu 6,9 kg	✓ Nici un efect asupra ADFI, ADG și FCR	Rajković și col., 2021
8% semințe de struguri timp de 30 de zile Purcei cu 9,13 kg	✓ Nici un efect asupra ADFI, greutateii corporale finale, ADG și FCR. ✓ A stimulat creșterea bacteriilor precum <i>Prevotella</i> și <i>Megasphaera</i>	Grosu și col., 2019
1% din semințe de struguri Porci cu 65 kg	✓ Nici un efect asupra greutateii corporale finale, ADG și FCR ✓ Creștere a ADFI	Vlaicu și col., 2019
8% făină de semințe de struguri (GSM) timp de 30 de zile Purcei cu greutatea de 9 kg	✓ A sporit activitatea enzimelor antioxidante, a scăzut nivelul citokinelor proinflamatorii și al TBARS și a îmbunătățit performanța de creștere a animalelor tratate cu aflatoxină B1.	Taranu și col., 2019
8% făină de semințe de struguri (GSM) timp de 28 de zile Purcei cu greutatea de 9 kg	✓ A diminuat supraexprimarea genelor și a ameliorat leziunile histologice ale ficatului și stresul oxidativ. ✓ A scăzut expresia genică și proteică a MAPK-urilor și a semnalizării NF-κB	Taranu și col., 2020
3-5% tescovină de vin roșu (RWPD) timp de 26 de zile Purcei la înțarcare	✓ A scăzut expresia ARNm NF-κB în stomac; ✓ A crescut expresiei ARNm NF-κB și TNF-α în ficat și mușchi; ✓ A scăzut expresiei ARNm TNF-α și IL-10 în ileon; ✓ A scăzut expresiei ARNm IL-10 în jejun, colon și ficat;	Sehm și col., 2006

PARTEA II
CERCETĂRI PROPRII
PART II
PERSONAL CONTRIBUTION

4. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

PHD THESIS AIM AND OBJECTIVES

Din multitudinea de antioxidanți naturali care pot fi incluși în hrana animalelor, în această cercetare a fost aleasă tescovina de struguri pentru a studia efectul său asupra tubului digestiv. Efectivul țintă de animale sunt porcii din rasa Pietrain crescuți în sistem intensiv.

Scopul general al acestei teze este de a evalua efectul includerii în dietă a tescovinei de struguri negri la porcii aflați în faza de îngrășare-finisare (180 zile) prin evaluarea performanței productive și a stării de sănătate, precum și a evaluării IHC mai multor markeri specifici ai inflamației (IL-1 β , TNF- α , MHC-II) și ai stării antioxidative (Nrf2 și p65) în intestin.

Obiectivele tezei de doctorat sunt următoarele:

1. Evaluarea histologică a particularităților morfofuncționale ale intestinului subțire la porcii din rasa Pietrain, care determină o eficiență ridicată a digestiei.
2. Analiza histologică asupra răspunsului dat de mucoasa intestinală în urma folosirii tescovinei din struguri negri ca adaos în dieta de bază a porcilor Pietrain.
3. Analiza markerilor pro-inflamatori (IL-1 β , TNF- α ȘI MCH-II) și a markerilor redox (Nrf2 și p65), prin tehnica imunohistochimică la nivel intestinal, în urma adaosului în hrană a tescovinei din struguri negri.
4. Analiza performanței de creștere a porcilor prin calcularea indicilor ADFI, ADG și FCR, în urma introducerii în hrană a tescovinei din struguri negri.

5. CADRUL ORGANIZATORIC ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE

THE ORGANIZATIONAL STRUCTURE IN WHICH THE RESEARCH WAS CARRIED OUT

Pentru a putea îndeplini obiectivelor propuse, a fost nevoie de un cadru organizatoric format dintr-un efectiv de porci din rasa Pietrain, aparținând fermei de îngrășat S.C. SUINPROD S.R.L. din județul Bacău.

Originară din Belgia, rasa de porc Pietrain este renumită pentru randamentul său ridicat și calitatea superioară a cărnii, având o istorie bogată și o distribuție globală. Crescută inițial în secolul al XIX-lea pentru piețele locale, popularitatea sa a crescut în Europa în anii 1950, iar astăzi este apreciată în întreaga lume. Porcii Pietrain au un raport ridicat de conversie a hranei și o rată de creștere rapidă și sunt bine adaptați la diferite condiții climatice și tipuri de hrană. Această eficiență contribuie la reducerea costurilor de producție și a consumului de resurse. Pentru a minimiza riscul problemelor de sănătate și pentru a promova o creștere durabilă în industria cărnii de porc, gestionarea adecvată a sănătății și performanței acestor animale este esențială.

La începutul cercetării, toți porcii se aflau în etapa de finisare în procesul de producție, având vârsta de 180 de zile și o greutate inițială de $85,09 \pm 5,11$ kg. Porcii au fost adăpostiți în țarcuri cu adăpători și hrănitore, și au avut acces liber la apă și hrană. Temperatura din interiorul adăpostului a fost controlată între 24-28°C, iar umiditatea relativă a fost controlată la 60-70%.

Din totalul efectivului din fermă, au fost selectați 60 de porci (egali în greutate și vârstă) care au fost împărțiți astfel: 10 porci pentru cercetarea în care s-a urmărit particularitățile morfostructurale ale rasei Pietrain și 50 de porci pentru a urmări efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri introdusă în hrană asupra sănătății tractului digestiv și a performanțelor de creștere.

Astfel au fost formulate: o dietă de bază și 4 diete experimentale cu doze crescând de tescovină de struguri negri adăugate și omogenizate în formula dietei de bază. Toate dietele au fost realizate pentru a îndeplini cerințele nutritive pentru porcii aflați în fazele de creștere-

finisare (75-100 kg) și faza de finisare (100-135 kg) recomandate de National Research Council (2012).

Dieta de baza este un furaj complet tip granule pentru porcii aflați la îngrășare cu următorii constituenți analitici: 16% proteină brută, 4,86% celuloză, 2,65% grăsimi, 1% lizină, 0,65% calciu, 0,55% metionină + cistină, 0,44% fosfor și 0,27% metionină (conform etichetei). Tescovina de struguri negri au fost furnizată de la un producător local, fiind alcătuită din boale de struguri și semințe. Materia primă a fost măcinată la o dimensiune a particulelor mai mică de 6 mm, introdusă și omogenizată în dieta de bază în 4 proporții diferite pentru fiecare lot experimental în parte (LE1 a primit 1g/kg, LE2 a primit 5g/kg, LE3 a primit 10g/kg și LE4 a primit 15g/kg). Tescovina a fost evaluată pentru conținutul total de fenoli (TPC) și de flavonoide (TFC), cât și pentru activitatea antioxidantă, conform metodologiei descrisă de (Luca și col., 2022). Rezultatele obținute se regăsesc în tabelul 5.1.

Tabel 5.1.

TPC, TFC și activitatea antioxidantă pentru tescovina de struguri negri

Table 5.1.

TPC, TFC and antioxidant activity for black grape marc

Probă	Conținutul total		Activitatea antioxidantă		
	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg TE/g)	DPPH (mg TE/g)	ABTS (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)
Tescovină	54,15 ± 0,46	3,09 ± 0,06	1,21 ± 0,03	3,68 ± 0,04	599,77 ± 7,02
Datele sunt prezentate ca medie ± abaterea standard (SD). Abrevieri: ABTS -2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) 6-acid sulfonic; DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; FRAP - putere antioxidantă reducătoare ferică; GAE, echivalenți acid galic; RE, echivalenți rutină; TE -echivalenți Trolox; TFC - conținut flavonoid total; TPC - conținut fenolic total.					

6. CERCETĂRI PRIVIND PARTICULARITĂȚI MORFOSTRUCTURALE ȘI FUNCTIONALE ALE INTESTINULUI SUBȚIRE LA PORCII DIN RASA PIETRAIN

RESEARCH ON MORPHOSTRUCTURAL AND FUNCTIONAL PARTICULARITIES OF THE SMALL INTESTINE IN PIETRAIN PIGS

Pentru a funcționa corect și optim, intestinul subțire trebuie să prezinte o morfostructură fiziologică, toate ducând în final la un metabolism general stabil și la o performanță mai mare a porcilor. Aspectele histologice ale intestinului subțire la porc sunt în mare parte asemănătoare cu cele întâlnite la mamifere. Porcii Pietrain reprezintă o rasă eficientă și productivă, fiind capabilă să convertească cu ușurință și la un nivel înalt hrana într-o rată mare de creștere. Obiectivul acestui capitol este de a evidenția particularităților morfostructurale și funcționale ale intestinului care explică eficiența ridicată a digestiei la porcii Pietrain.

6.1. Material și metodă

Cercetarea s-a desfășurat conform protocolului experimental din (Tabel 6.1.), animalele fiind mereu supravegheate din punct de vedere medical. Animalele au fost îngrijite în conformitate cu Legea 43/2014 privind manipularea și protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale și cu Directiva 98/58/CE a Consiliului UE privind protecția animalelor de fermă. Protocolul experimental a fost aprobat de Comitetul de Etică al Facultății de Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științe Vieții "Ion Ionescu de la Brad".

După terminarea perioadei experimentale, porcii au fost sacrificați în cadrul abatorului S.C. NICBAC PROD S.R.L., de unde totodată au fost prelevate probe din anumite segmente ale intestinului subțire: duoden, jejun și ileon.

În cele din urmă, cercetarea a fost continuată în Laboratorul de Histologie și Embriologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași pentru a evalua din punct de vedere histologic probele prelevate prin tehnica histologică de includere la parafină.

Tabel 6.1.

Protocol experimental pentru a evidenția particularităților morfostructurale și funcționale ale intestinului la porcii Pietrain

Table 6.1.

Experimental protocol to highlight the morphostructural and functional features of the intestine in Pietrain pigs

Lot experimental	Număr porci	Furajare	Mod de administrare	Regim și durată
Rasa Pietrain vârstă 180 de zile greutate 85,09 ± 5,11 kg	10 (5 femele și 5 masculi)	Furaj complet tip granule pentru îngrășat	Ad libitum	Zilnic/ 90 zile

După sacrificarea porcilor în abator, au fost prelevate fragmente din treimea anterioară a fiecărui segment de intestin subțire și de colon din intestinul gros. Piesele au fost fixate în 10% formalină neutră tamponată pentru 1 h în laborator, apoi au fost transferate în Bouin în laborator timp de 12 ore. Următoarea etapă a fost de deshidratare realizată în diferite concentrații de soluții de etanol. Piesele au fost impregnate și incluse în parafină și secționate la 5μm. Secțiuni seriate au fost preparate din fiecare bloc de parafină și supuse colorării în urma protocolului standard de colorare a hematoxilinelor și eozinei (H&E) și montate cu balsam de Canada. Preparatele histologice obținute au fost vizualizate și microfotografiate cu ajutorul microscopului optic cu cameră Leica.

6. 2. Rezultate

Structura histologică generală pentru mucoasa intestinului subțire a fost caracteristică pentru fiecare secțiune examinată și nu au fost raportate diferențe majore între secțiuni ce aparțineau aceleași zone intestinale, de la toți porcii de-a lungul cercetării. Intestinul subțire este împărțit în duoden, jejun și ileon; toate cele 3 zone având structura histologică dispusă pe patru straturi concentrice: mucoasă, submucoasă, musculoasă și seroasă.

În urma studiilor făcute pe secțiuni din intestinul subțire la porcii Pietrain, s-a observat că mucoasa duodenului este alcătuită din epiteliu columnar cu platou striat, lamina propria cu glande Lieberkühn și muscularis mucosae. Grosimea medie a mucoasei duodenale a variat între 835μm și 1.195μm, având o grosime medie de 960μm. Vilozițiile intestinale sunt în general polimorfe, unele dintre ele având formă ramificată. Înălțimea vilozițiilor duodenale variază între 194μm și 250μm, reprezentând aproximativ un sfert din întreaga înălțime a mucoasei. Epiteliul de la suprafața intestinului este format din enterocite, celule

caliciforme, celule enteroendocrine, celule Paneth și celule stem. Enterocitele au dimensiuni variabile în funcție de zona ocupată; acestea sunt cubice și mici în glanda Lieberkühn, puțin mai înalte la baza vilozităților între 17μm și 20μm și cu înălțimea cea mai mare în apexul vilozităților, ajungând până la aproximativ 30μm. Aceste aspecte variabile sunt în corelație cu ciclul de viață al enterocitelor ce este de aproximativ 5 zile. Enterocitele se mai numesc și celule absorbitive deoarece polul apical prezintă microvili ce măresc suprafața de absorbție intestinală. Zona descrisă de microvili se numește platoul striat al epitelului și de asemenea este în corelație cu maturitatea enterocitelor, variind ca dimensiune. În cazul celulelor de la baza vilozităților, platoul striat este foarte subțire (mai puțin de 0,5μm) și crește treptat până la 1,5μm în cazul enterocitelor din apexul vilozităților.

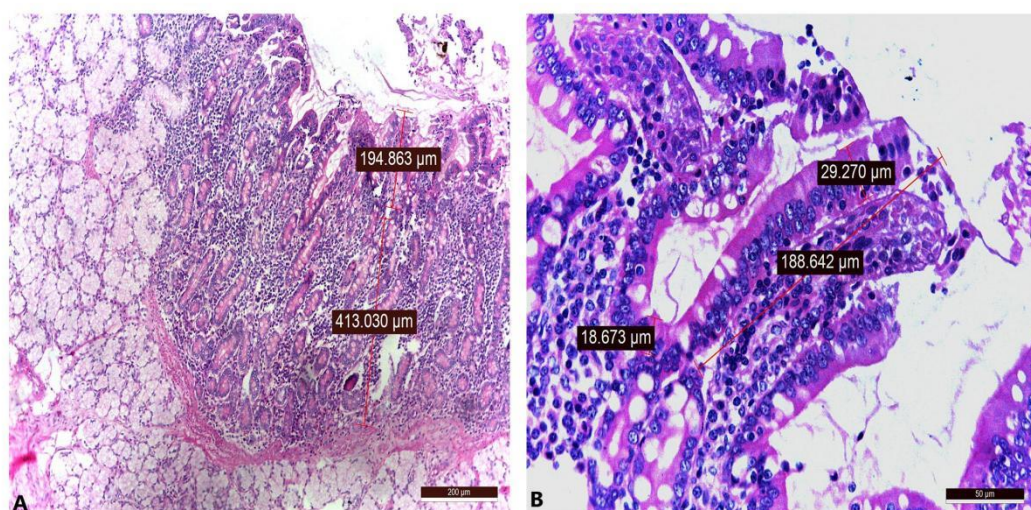


Figura .6.1. Duoden de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Vilozitățile intestinale, lamina propria, glandele Lieberkühn și împreună cu muscularis mucosae alcătuiesc mucoasa duodenului. Sunt observate glandele Brünner în submucoasă, formate în principal din celule mucoase. (B) vilozitățile duodenale sunt alcătuite dintr-un ax central de țesut conjunctiv și un epiteliu prismatic cu platou striat de acoperire. Înălțimea enterocitelor variază de la 29-30μm în vârful vilozității la 17-18μm la baza vilozităților. Colorație HEx100 (A, B) (Original)

Figure 6.1. Duodenum of 180-day-old Pietrain pigs. (A) Intestinal villi, lamina propria, Lieberkühn glands and muscularis mucosae make up the mucosa of the duodenum. Brunner's glands are seen in the submucosa, consisting mainly of mucous cells. (B) The duodenal villi consist of a central axis of connective tissue and a prismatic epithelium with a striated plate serving as a covering. The height of the enterocytes ranges from 29-30μm at the apex of the villi to 17-18μm at the base of the villi. HEx100 staining (A, B) (Original)

Tot în cadrul epitelului intestinal regăsim celulele caliciforme cu rol în secreția mucusului. Acestea sunt mai abundente în zona profundă a glandelor Lieberkühn și mai puțin

spre vârful vilozităților. Ciclul lor de viață este apreciat la 3-4 zile. Alături de celulele caliciforme se găsesc și celule enteroendocrine ce aparțin sistemului neuro-endocrin și celulele Paneth. Toate tipurile de celule provin din celule stem intestinale ce se găsesc cu precădere jumătatea bazală a glandelor Lieberkühn. Acestea se mai numesc și celule regenerative și din punct de vedere histologic, celulele sunt descrise ca fiind poliedrice, mici, cu un nucleu ovoidal și eucromatic, fiind așezate pe membrana bazală a epitelului printre celulele caliciforme și enterocite. Glandele Lieberkühn iau naștere prin invaginarea epitelului de la suprafața intestinală, formându-se glande tubuloase simple. Totalitatea glandelor formează stratul glandular din mucoasa duodenului, iar în cazul porcilor studiați, grosimea acestuia a fost cuprinsă între 380μm și 420μm.

În cazul porcilor Pietrain, *muscularis mucosae* prezintă aceeași dispoziție și structură cu cea descrisă la celelalte mamifere. Fibrele musculare netede sunt dispuse concentric la baza stratului glandular, cu o grosime ce poate ajunge până la 25μm. Unele fibre musculare sunt distribuite în lungul axului central al vilozităților intestinale, alcătuind mușchiul Bruke (grosime lui putând ajunge de la 40 până la 50μm) cu rol în mișcarea vilozităților.

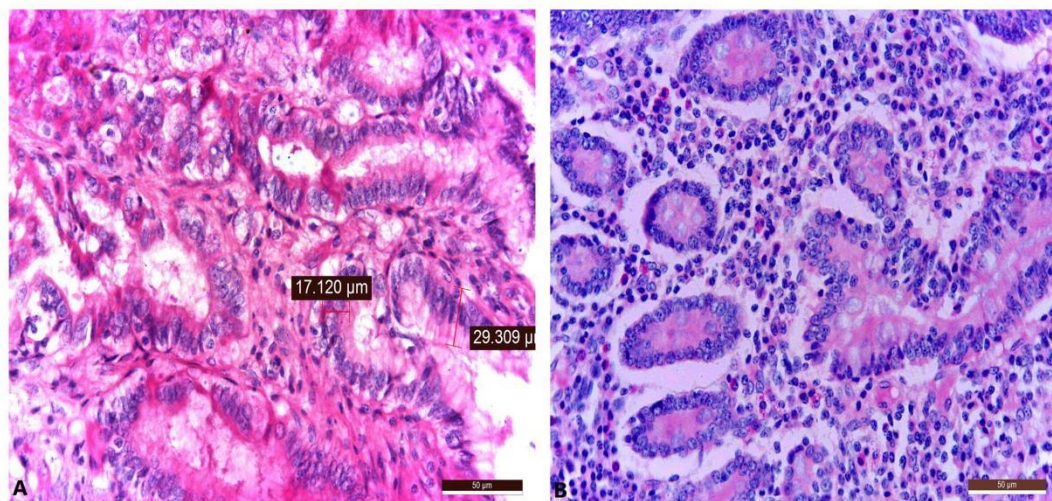


Figura 6. 2. Duoden de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Înălțimea enterocitelor de la baza vilozităților intestinale cu o medie de aproximativ 23μm. (B) În jurul glandelor Lieberkühn se poate observa o infiltrație limfo-plasmocitară cu numeroase limfocite și plasmocite dar și euzinofile și mastocite. Colorație HEx400 (A); Colorație PASx400 (B) (Original)

Figure 6. 2. Duodenum of 180-day-old Pietrain pigs. (A) Height of enterocytes at the base of the intestinal villi averaging approximately 23μm. (B) A lymphoplasmacytic infiltration can be seen around the Lieberkühn glands with numerous lymphocytes and plasma cells but also eosinophils and mast cells. HEEx400 staining (A); PASx400 staining (B) (Original)

Submucoasa duodenului este alcătuită din glandele Brünner (particular speciei, pe lângă acinii mucoși sunt prezenți și acinii serosi) și țesut conjunctiv fibros redus cu numeroase vase de sânge, vase limfatice și ganglioni nervoși vegetativi de mici dimensiuni ce aparțin plexului Meissner. Grosimea medie a submucoasei variază între 208μm și 500μm.

Fibre musculare netede dispuse pe stratul circular intern și stratul longitudinal exter, alcătuiesc musculoasa. Grosimea acesteia în cazul porcilor Pietrain, a fost una uniformă de-a lungul întregului duoden cât și între indivizi. Grosimea medie pentru stratul circular intern este de 200μm, iar pentru stratul longitudinal extern, grosimea medie este aproximativ 125μm. Particular speciei este prezența plexului mienteric Auerbach (plex nervos vegetativ) foarte dezvoltat, localizat între cele două straturi de mușchi.

Seroasa duodenală este alcătuită dintr-un țesut mezotelio-fasciculat cu o grosime medie de 60-80μm. Zona subseroasei ocupă 90 % din grosimea toatală a seroasei și conține propriul plex vasculo-nervos.

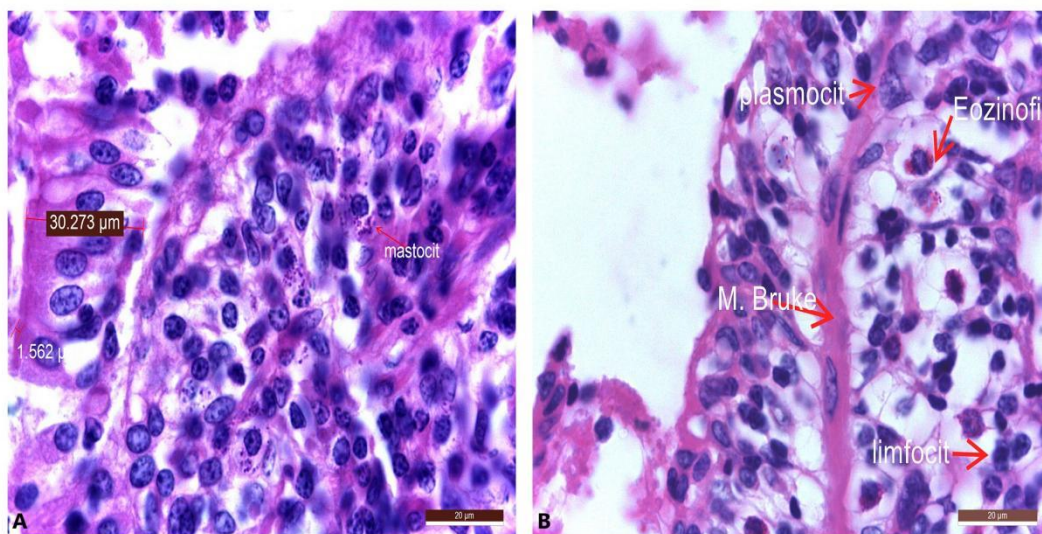


Figura 6.3. Duoden de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Înălțimea enterocitelor din vârful vilozităților este de aproximativ 30μm. Platoul striat din cadrul epiteliului de acoperire intestinală este PAS pozitiv și mult mai gros începând cu treimea mijlocie până în apexul vilozității. (B) Mușchiu Bruke poate fi observat până în vârful vilozității duodenale. Enterocitele sunt detașate de membrana bazală a epiteliului. Colorație PASx1000 (A, B) (Original)

Figure 6.3. Duodenum of 180-day-old Pietrain pigs. (A) The height of the enterocytes at the tip of the villi is approximately 30μm. Microvilli of enterocytes are PAS positive and much thicker from the middle third to the apex of the villi. (B) Bruke's muscle can be seen up to the apex of the duodenal villi. Enterocytes are detached from the basement membrane of the epithelium. PASx1000 staining (A, B) (Original)

Următoarele segmente analizate au fost jejunul și ileonul pentru porcii din rasa Pietrain. Aceste porțiuni cuprind *plicae circularis* sau valve Kerking complet circulare. În prima jumătate a jejunului, acestea sunt mai numeroase și cu o înălțime mai mare decât cele din prima porțiune a ileonului, ca mai apoi să dispară complet la capătul distal al ileonului. Valvele Kerking sunt pliuri permanente ce înconjoară suprafața internă a lumenului intestinal.

Mucoasa jejunului nu prezintă diferențe structurale majore între indivizi, iar înălțimea sa medie este de 1006μm. Cea mai mare înălțime a vilozităților intestinale este întâlnită în jejun, valoare fiind cuprinsă între 162μm și 246μm. Lamina propria găzduiește atât glandele Lieberkühn cât și numeroase aglomerări limfoide interglandulare. Spre deosebire de duoden, în jejun se găsesc mai multe glande tubuloase simple cu cea mai mare înălțime măsurată la cele 3 zone de intestin subțire (380-604μm). Numărul celulelor caliciforme, atât din epiteliul de acoperire cât și din epiteliul glandelor tubuloase, devine din ce în ce mai mare odată cu apropierea de valvula ileo-cecală. Mucoasa și submucoasa jejunului măsoară împreună o valoare medie de 1900μm.

În zona distală a jejunului și în special în ileon sunt prezente formațiuni limfoide (PP) în submucoasa peretelui intestinal. Abundența acestor aglomerări limfoide stabilește o grosime a submucoasei aproape dublă în jejun (în medie aproximativ 985μm) și ileon (în medie aproximativ 760μm) față de cea duodenală. Plăcile Peyer se extind din submucoasă în stratul superior, întrerupând la întâmplare *muscularis mucosae*, ajungând până la suprafața intestinală. În zonele unde sunt aceste formațiuni limfoide, mucoasa intestinală nu prezintă vilozități intestinale. Submucoasa jejunului și a ileonului nu prezintă formațiuni glandulare ca cele întâlnite la duoden.

Mucoasa ileonului este cea mai mică dintre cele 3 segmente intestinale analizate cu o valoare cuprinsă între 347μm și 454μm; astfel implicit și înălțimea vilozităților (125-167μm) cât și înălțimea glandelor Lieberkühn (347-563μm) sunt mai mici decât cele măsurate în duoden și ileon. Grosimea stratului de mușchi ce alcătuiește *muscularis mucosae* este cuprinsă între 64μm și 80μm.

Din punct de vedere morfologic, musculoasa din jejun și ileon este asemănătoare cu cea din duoden, doar cu diferența că straturile de mușchi (circular intern și longitudinal extern) devin mai groase spre extremitatea distală a intestinului subțire dar rămânând egale proporțional. Inervația motorie a musculaosei este asigurată de prezența plexului Auerbach

între straturile de mușchi. Seroasa jejunului și a ileonul nu prezintă modificări față de cea a duodenului.

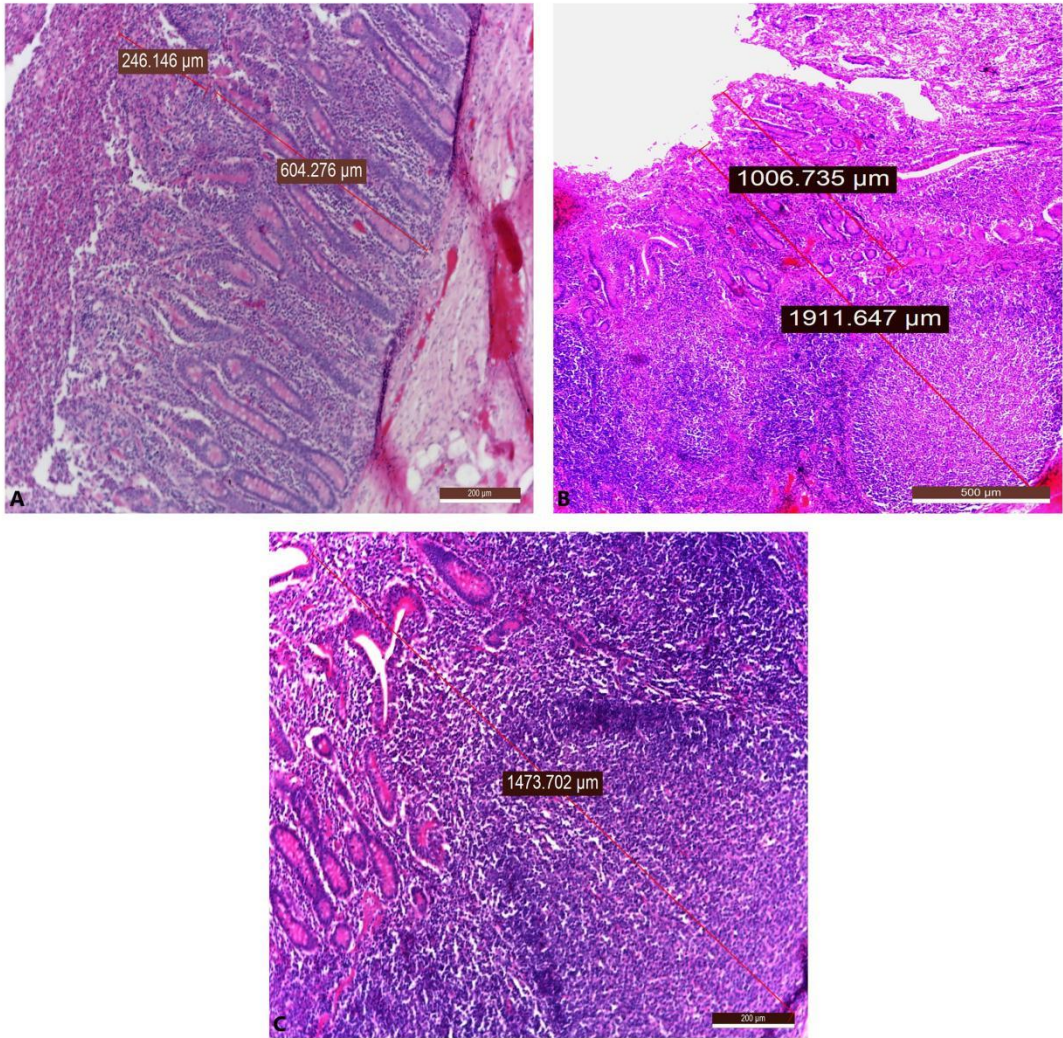


Figura 6.4. Jejun de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Structura histologică a mucoasei. Vilozitățile sunt înalte, glandele Lieberkühn au o lungime cuprinsă între 380-604μm, muscularis mucosae este întreruptă din loc în loc de aglomerări limfoide localizate în submucoasă. (B) și (C) Structura histologică a submucoasei. Plăcile Peyer sunt alcătuite din limfonoduli mari înconjurați de infiltrații limfoide difuze. Grosimea totală a submucoasei și mucoasei este cuprinsă între 1473 μm și 1911μm. Colorație HEx100 (A,B), PASx1000 (C) (Original)

Figure 6.4. Pietrain pig jejunum at 180 days of age. (A) Histologic structure of the mucosa. The villi are high, the Lieberkühn glands are between 380-604μm in length, the muscularis mucosae is interrupted from place to place by lymphoid agglomerations localized in the submucosa. (B) and (C) Histologic outline of the submucosa. Peyer's patches consist of large lymph nodes surrounded by diffuse lymphoid infiltrates. The total thickness of the submucosa and mucosa ranges from 1473 μm to 1911μm. HEx100 staining (A,B), PASx1000 (C) (Original)

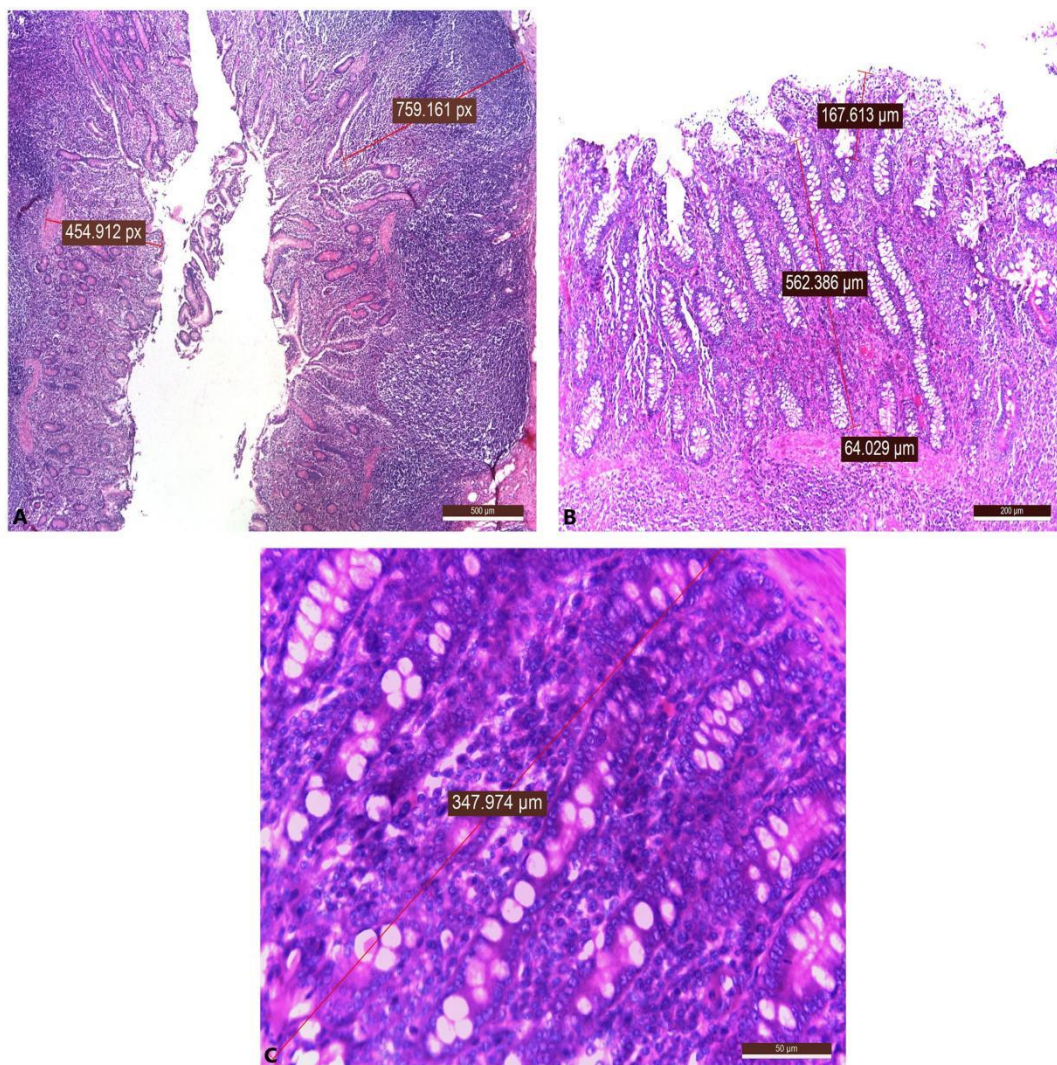


Figura 6.5. Ileon de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Numeroși limfonoduli localizați în submucoasă. (B) și (C) Structura histologică a mucoasei. Vilozițiile intestinale sunt înalte de 125-167μm, glandele Lieberkühn sunt lungi de 347-563μm, muscularis mucosae are grosimea 64-80μm și este întreruptă de limfonoduli mari cu infiltrație limfoidă difuză. Colorație HEx100 (A,B), PASx1000 (C) (Original)

Figure 6.5. Pietrain pig ileum at 180 days of age. (A) Numerous lymph nodes localized in the submucosa. (B) and (C) Histologic structure of the mucosa. Intestinal villi are 125-167μm high, Lieberkühn's glands are 347-563μm long, muscularis mucosae is 64-80μm thick and is interrupted by large lymphnoduli with diffuse lymphoid lymphoid infiltration. HEx100 staining (A,B), PASx1000 (C) (Original)

6. 3. Discuții

La porcul adult, din lungimea totală a intestinului subțire, duodenul ocupa aproximativ 4%, jejunul între 88% și 91% și ileonul maxim 5% (Lærke și Hedemann, 2012).

În cazul porceilor nou-născuți, proporția duodenului este identică cu cea întâlnită la adult, diferențe constatându-se la nivelul jejunului și ileonului care par identice și greu de deosebit (Lærke și Hedemann, 2012). Din punct de vedere microscopic, toate compartimentele intestinului subțire au aceeași structură. De la interior spre exterior sunt prezente: mucoasa, submucoasa, musculoasa și seroasa. Suprafața de contact a intestinului subțire cu mediul luminal este reprezentată de mucoasă, care la rândul său este formată din 3 straturi. *Muscularis mucosae* este stratul cel mai profund și separă mucoasa de submucoasă. Stratul mediu al mucoasei este lamina propria care asigură suport structural atât pentru epiteliu cât și pentru elementele vasculare, limfatice și neurale. Cel de-al treilea strat al mucoasei intestinale este reprezentat de un singur strat de celule columnare, mereu în contact cu conținut intestinal și într-o continuă modificare.

Observațiile realizate de noi la porcii din rasa Pietrain sunt în concordanță cu cele descrise în literatura de specialitate. Tractul gastrointestinal la animale este responsabil de digestia și absorbția energiei și a nutrienților. Aceste roluri centrale depind de structura, numărul și activitatea metabolică a celulelor care îl compun. La monogastrice, digestia și absorbția sunt funcții integrate (Pekas și Wray, 1991) care devin mai eficiente în intestinul subțire datorită măririi suprafeței de absorbție asigurată de mucoasă, vilozități și microvili. În acest mod, suprafața de absorbție crește de până la cincizeci de ori (Caspary, 1987; Smith, 1992). În plus, suprafața intestinului subțire este mărită de trei ori prin numeroase pliuri circulare ale submucoasei (Caspary, 1987). Cu toate acestea, capacitatea de digestie și absorbție a intestinului subțire nu sunt fixe în fiecare stadiu de dezvoltare, deoarece acestea depind, se adaptează și răspund la diferiți factori alimentari.

Măsurătorile histo-morfologice și ale activității funcționale ale tractului gastrointestinal la porci, au arătat că apar schimbări foarte importante odată cu vârsta și în principal în perioada de înțărare în intestinul subțire. La fătare, mucoasa prezintă vilozități digitiforme, cu o rată de creștere rapidă de la 200μm la 500μm în primele 3 zile de viață (Skrzypek și col., 2010). După această vârstă, vilozitățile intestinale încep să crească în diametru, iar forma lor digitiformă să se transforme în una ramificată, aspect observat și la aceasta rasă (Cera și col., 1988). Adâncimea criptelor intestinale la nou-născuți este cea mai mică (Skrzypek și col., 2010), crescând odată cu gradul de maturare a mucoasei intestinale. Toate aceste modificări morfologice sunt sub influența colostrului. Rolul lui în hrănirea porceilor este de a crește lungimea și suprafața absorbantă precum și activitatea enzimatică

de la nivelul enterocitelor (Wang și Xu, 1996; Zhang și col., 1997). Substanțele nutritive din lapte determină maturarea intestinului și o creștere a adâncimii criptelor prin proliferare celulară (Huygelen și col., 2014). Într-un proces fiziologic, volumul celulelor ce alcătuiesc epiteliul intestinal este menținut de un echilibru dinamic și permanent între producerea de noi celule la baza criptelor Lieberkühn și pierderea prin moarte celulară în partea superioară a vilozităților (Clarke, 1973). Este demn de menționat faptul că rata de reînnoire celulară a epiteliului intestinului subțire este cea mai rapidă dintre toate țesuturile porcului (Pekas și Wray, 1991), adică sunt necesare două până la patru zile pentru a înlocui întregul epiteliu al vilozitatilor al unui purcel de trei săptămâni (Moon, 1971).

Înțărirea la porcei este o perioadă critică deoarece se trece la o dietă solidă cu un consum mai scăzut de hrană. Astfel se instalează malabsorbția care duce la o rată de creștere mai mică ca și răspuns final. Numeroase rapoarte au arătat că mucoasa intestinului subțire al porceilor suferă modificări histologice după înțărirea și anume o atrofie a vilozitatilor și o hiperplazie a criptelor (Kenworthy, 1976). Această atrofie a vilozitatilor se produce fie printr-o rată crescută de pierdere celulară în lungul lor, fie printr-o reducere a diviziunii celulare în cripte. Toate modificările morfologice pot fi influențate de factori alimentari sau infecțioși și sunt mai drastice când înțărirea se face la o vârstă mai fragedă (Smith, 1984). Potrivit lui (Hampson, 1986), după 24 de ore de la înțărirea, înălțimea vilozităților a fost redusă la 75 % din valorile anterioare și a continuat să scadă până în a cincea zi de la înțărirea la aproximativ 50 % din valorile inițiale găsite la înțărirea. Aceste rezultate au fost confirmate de (Miller și col., 1986), în timp ce (Cera și col., 1988) au raportat o reducere a înălțimii microvililor timp de trei până la șapte zile după înțărirea.

Unii autori susțin faptul că aceste modificări sunt asociate cu scăderea activității enzimelor și mai puțin cu funcția de absorbție (Hampson și Kidder, 1986; Kelly și col., 1991b; Miller și col., 1986). Activitatea lactazei scade progresiv cu vârsta porceilor, indiferent de înțărirea sau nu, dar suprimarea activității este mai severă imediat după înțărirea (Kelly și col., 1991a). Activitățile enzimatice ale lactazei și sucrozei au atins valori minime la patru zile după înțărirea (Hampson și Kidder, 1986), iar activitățile maltazei și a amilazei au crescut rapid după înțărirea la 6 săptămâni (Kelly și col., 1991b).

La porcul adult, forma vilozităților se menține uniformă în cazul duodenului și a jejunului, în comparație cu cea a ileonului. De regulă, înălțimea vilozităților într-un intestin subțire matur, este în creștere începând cu duodenul până la mijlocul jejunului, ca mai apoi să

scadă treptat până la ileon (Skrzypek și col., 2010; van Ginneken, 2012; Wiyaporn și col., 2013). Densitatea vilozităților intestinale este cuprinsă între 1000/cm² și 1200/cm² (Lallès și col., 2004). Glandele Lieberkühn sunt de regulă mai adânci în treimea proximală a intestinului subțire, față de porțiunea mijlocie și treimea distală (Oste și col., 2010).

Sistemul imunitar al mucoasei intestinale reprezintă primul mecanism de apărare împotriva multiplexelor molecule exogene. El are rolul de a sorta și elimina potențialii agenți patogeni ingerați odată cu alimentele (Jung și col., 2010). În mucoasa și submucoasa intestinului există populații limfoide difuze ce alcătuiesc țesutul limfoid asociat sistemului gastrointestinal (GALT). Numeroase limfocite și plasmocite se găsesc în epiteliul intestinal dar și în lamina propria unde sunt organizate sub forma foliculilor limfoizi. Aceste forme de organizare se numesc Plăci Peyer, sunt specifice țesutului limfatic din intestinul subțire și gros și comunică cu ganglionii limfatici proximali (ganglionul mezenter) pentru a filtra limfa ce se drenează din peretele intestinal. Plăcile Peyer sunt centre inductive pentru imunitatea mucoasei intestinale dar și pentru întregul tract gastrointestinal (Vazquez-Torres, 2000). La porci, plăcile Peyer apar sub forma foliculilor limfoizi în jejun, pe când în ileon aceste plăci sunt continue și întinse de la porțiunea distală a ileonului până în proximitatea colonului (Binns și Licence, 1985). La animalele adulte, plăcile Peyer pot fi observate macroscopic în peretele intestinului subțire.

Țesutul limfoid asociat mucoasei intestinale este important pentru a menține homeostazia tubul digestiv, luptând direct în procese inflamatorii, infecții sau procese degenerative intestinale (Wasowicz și col., 2018). Limfocitele T sunt predominante în structura vilozităților intestinale, cele CD8⁺ sunt evidente intraepitelial și subepitelial, iar limfocitele T CD4⁺ sunt localizate în lamina propria lângă plexul capilar (Vega-Lopez și col., 1993). În vilozități și cripte este o expresie crescută a antigenelor CMH clasa II, chiar dacă o parte dintre acestea este reprezentativă pentru endoteliul capilarelor (Wilson și col., 1996). La porc, tot în cadrul GALT se regăsesc ambele tipuri de celule dendritice convenționale cu rol de celule prezentatoare de antigen (Inman și col., 2010). În stratul glandular al mucoasei și mai exact în jurul glandelor Lieberkühn sunt evidențiate plasmocite secretoare de IgM și IgA dar și numeroase eozinofile. Interacțiunile dintre celulele imunitare sunt reglementate de maturitatea organismului. La animalele tinere, limfocitele T CD4⁺ din mucoasa intestinală cooperează atât cu celulele endoteliale ale capilarelor cât și cu celulele dendritice. La animalele adulte, limfocitele T CD4⁺ interacționează exclusiv cu celulele dendritice (Inman

și col., 2010). Se poate afirma ca răspunsul imun la nivelul mucoasei intestinale se realizează plecând de la celulele prezentatoare de antigen localizate la nivelul plăcilor Peyer. Un astfel de exemplu sunt celulele dendritice care își pot extinde prelungiri dincolo de epiteliu pentru a putea prelua antigenele luminale. Tot ele vor procesa și vor prezenta antigenul limfocitelor (Harman și col., 2013; Kelsall și Strober, 1996; Rescigno și Chieppa, 2005). Limfocitele B din plăcile Peyer sunt stimulate de către celulele dendritice activate de bacterii comensale pentru a se transforma în plasmocite secretoare de IgA (Macpherson și Uhr, 2004).

În cadrul musculoasei intestinului se constată prezența plexului Auerbach. Acesta este un plex nervos vegetativ mienteric, localizat între cele două straturi de mușchi netezi, fiind alcătuit din fibre nervoase și neuroni. La porc, acest plex este foarte dezvoltat, aspect morfologic ce poate fi asociat cu un tranzit al alimentelor din duoden spre jejun foarte rapid (aproximativ 5 secunde).

Sistemul nervos enteric joacă un rol important în răspunsul imun în cazul proceselor patologice digestive (Anton și Shanahan, 1998; De Jonge și col., 2005). Se cunoaște faptul că organele limfoide primesc impulsuri de la sistemul nervos prin fibre nervoase de la neuroni colinergici și adrenergici (Felten și col., 1985). Fibrele nervoase eliberează neuropeptide cu rol modulator pentru celulele imune (Reusch și col., 1988). La rândul lor, celulele imune au receptori pentru somatostatina, catecolamine, polipeptidă vasoactivă, substanță P, neuropeptida Y sau galanină. Aceste neuropeptide le modulează activitatea proliferativă și/sau producția de imunoglobuline (Stead și col., 1987). La animalele nou-născute au fost raportate cele mai ridicate cantități de neuropeptide iar cele mai evidente modificări în rândul populațiilor de limfocite s-au înregistrat la animalele în vârstă de 4 luni, dar fără a se face vreo legătură directă între modificările apărute și neuropeptide. Cu toate acestea, neuropeptida galanină are efecte antiproliferative pentru anumite populații de limfocite (Trejter și col., 2002) și ar putea reduce nivelul limfocitelor din sistemul digestiv atunci când sunt niveluri ridicate al acestei neuropeptide. Un antagonist la nivel intestinal pentru galanină poate fi polipeptida intestinala vasoactivă care are efecte stimulatorie și antiapoptotice pentru limfocite (Delgado și Ganea, 2000). În acest mod se poate obține un echilibru în tubul digestiv între sistemul imunitar și sistemul nervos enteric atunci când sunt provocări din partea factorilor alimentari (Wasowicz și col., 2018).

6. 4. Concluzii parțiale

La vârsta de 180 de zile, porcii din rasa Pietrain au avut peretele duodenal de două mai subțire decât cel al ileonului și al jejunului datorită aglomerărilor limfoepiteliale din mucoasă și a foliculilor limfoizi din submucoasă.

Înălțimea vilozităților urmează o curbă descendentă, începând cu duodenul până la ileon.

Adâncimea criptelor intestinale este mai mică în ultima treime a ileonului și mai mare în treimea anterioară a ileonului, în jejun și duoden.

Enterocitele prezintă un ciclu de viață care începe la baza criptelor intestinale, se maturează și cresc în înălțime odată cu deplasarea lor spre apexul vilozităților, ca mai apoi să se desprindă din epiteliu.

Volumul celulelor caliciforme crește atât la nivelul glandelor Lieberkühn dar și în epiteliul de la suprafața vilozităților pe măsură ce se ajunge de la începutul intestinului subțire spre colon.

Mușchiul Bruke este foarte dezvoltat și este prezent până în apexul vilozităților intestinale.

Corelațiile între morfoarhitectura intestinului subțire și funcțiile neuro-endocrin-imune cresc eficiența productivă în cazul porcilor din rasa Pietrain.

7. ANALIZA HISTOLOGICĂ PRIVIND REACTIVITATEA MUCOASEI INTESTINALE ÎN URMA INTRODUCERII ÎN HRANĂ A TESCOVINEI DE STRUGURI LA PORCII DIN RASA PIETRAIN

HISTOLOGIC ANALYSIS OF THE REACTIVITY OF THE INTESTINAL MUCOSA FOLLOWING THE INTRODUCTION OF GRAPE TESCOVINE IN PIETRAIN PIGS

În prezent, se desfășoară un efort de cercetare major pentru a identifica intervențiile nutriționale capabile să îmbunătățească rezistența la infecții. Manipularea nutrițională a sistemului imunitar în general, și a GALT în special, poate nu doar să sporească răspunsul protector la infecții, ci și să reducă inflamația și să restabilească homeostazia. Obiectivul acestui capitol este de a analiza din punct de vedere histologic reactivitatea mucoasei intestinale în urma introducerii în hrană a tescovinei din struguri negri în doze crescânde de la 1 g, 5 g, 10 g și 15 g/kg furaj.

7. 1. Material și metodă

Cercetarea s-a desfășurat conform protocolului experimental din tabelul 7.1., animalele fiind mereu supravegheate din punct de vedere medical. Animalele au fost îngrijite în conformitate cu Legea 43/2014 privind manipularea și protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale și cu Directiva 98/58/CE a Consiliului UE privind protecția animalelor de fermă. Protocolul experimental a fost aprobat de Comitetul de Etică al Facultății de Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științele Vieții "Ion Ionescu de la Brad".

După terminarea perioadei experimentale (3 luni), porcii au fost sacrificați. Au fost prelevate probe din anumite segmente ale tubului digestiv: duoden, jejun, ileon și cecum pentru examenul histologic desfășurat în cadrul Laboratorului de Histologie și Embriologie a Facultății de Medicină Veterinară Iași.

Rezultatele analizei morfometrice au fost exprimate ca medie $\pm$ deviație standard (SEM). Pentru a evalua variația datelor între grupuri, s-a derulat ANOVA cu o singură cale. Diferențele dintre medii au fost calculate cu ajutorul testului Duncan cu intervale multiple. Un nivel semnificativ de 0,05 a fost utilizat. Analizele au fost efectuate utilizând pachetul Excel Microsoft Office.

Experimental protocol for feeding black grape tescovine

Descriere porci	Distribuție loturi	Nr de porci	Furajare	Doza de tescovină în g/kg furaj (%)	Mod de administrare	Regim și durată
Rasa Pietrain vârstă 180 de zile greutate 85,09 ± 5,11 kg	LM	10	Furaj complet tip granule pentru îngrășat		Ad libitum	Zilnic/ 90 zile
	LE1	10		1g/kg (0,1%)		
	LE2	10		5g/kg (0,5%)		
	LE3	10		10g/kg (1%)		
	LE4	10		15g/kg (1,5%)		

7. 2. Rezultate

Pentru a aborda efectele potențiale ale produselor vegetale bogate în polifenoli asupra capacității de absorbție prin modificarea înălțimii vilozităților și adâncimea criptelor, au fost analizate secțiuni histologice din duoden și jejun, deoarece aceste părți ale intestinului subțire sunt principalele locuri de absorbție a nutrienților și sunt preconizate a fi modificări histologice în aceste părți ale intestinului subțire. Măsurătorile au continuat și pentru ileon și cecum pentru a urmări o posibilă reactivitate a țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale la polifenolii din tescovina de struguri negri.

Vilozitățile duodenului de la LM sunt în medie mai scurte ($202.2 \pm 3.1 \mu\text{m}$) și cu un diametru ușor crescut datorită infiltrațiilor limfoide în lamina propria. Au fost surprinse enterocite care se desprind de la vârful vilozităților (Figura 7.1.). Valorile calculate pentru înălțimea vilozităților pentru LM sunt semnificativ mai mici față de LE1, LE2, LE3 și LE4 ($P < 0,05$) (Figura 7.2.). Adâncimea criptelor intestinale au avut o medie de $425,44 \pm 21,8 \mu\text{m}$ iar raportul dintre înălțimea vilozităților duodenale și adâncimea criptelor a fost în medie de $0,47436 \pm 0,04 \mu\text{m}$, fiind semnificativ mai mică față de restul loturilor experimentale ($P < 0,05$) (Tabel 7.2.).

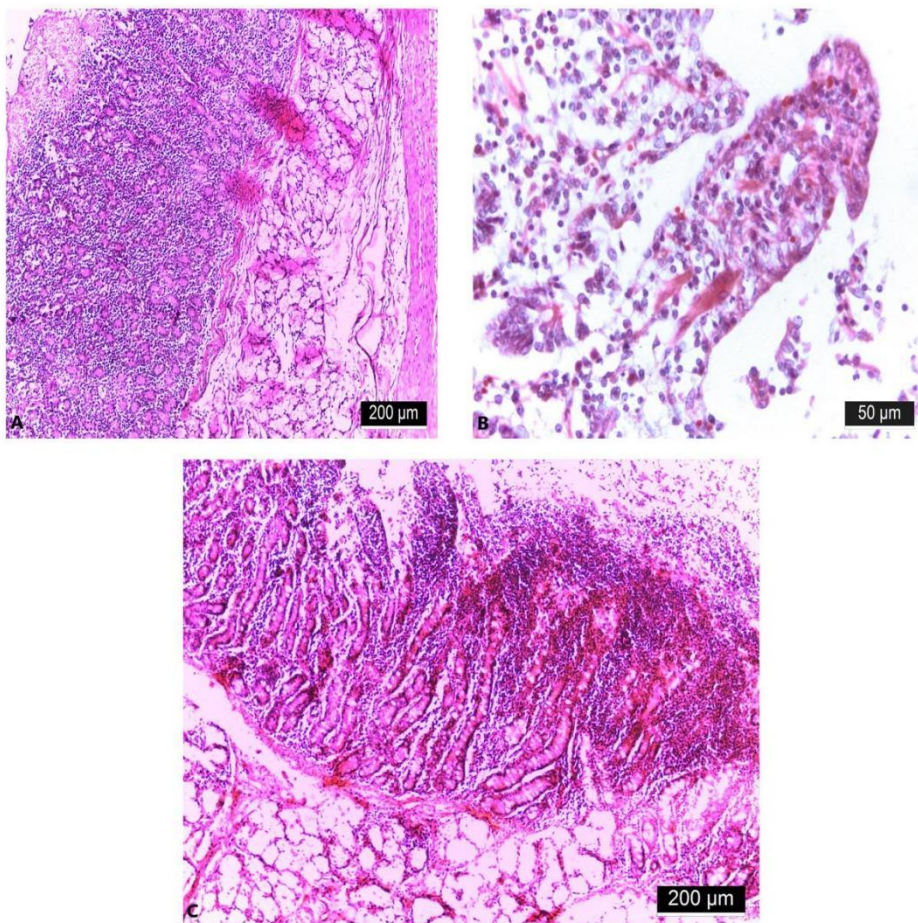


Figura 7.1. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot martor. (A) Aspect general al peretelui duodenal (mucoasă, submucoasă și musculoasă). (B) Epiteliul de la suprafața vilozității este desprins. (C) Infiltrație limfoplasmocitară periglandulară în mucoasă. Colorație HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)

Figure 7.1. Duodenum of Pietrain pig. Control group. (A) General appearance of the duodenal wall (mucosa, submucosa and muscularis). (B) The epithelium at the surface of the villous is detached. (C) Periglandular lymphoplasmacytic lymphocytic infiltration in the mucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)

Începând cu adăugarea în dietă a tescovinei de struguri negrii, au fost observate diferențe atât la nivel morfostructural (Figura 7.1.; Figura 7.3.; Figura 7.4.; Figura 7.5. și Figura 7.6.) cât și la nivel statistic (Tabel 7.2.) și (Figura 7.2.).

Tabel 7.2.

Efectele introducerii tescovinei în hrana porcilor asupra morfostructurii duodenale

Table 7.2.

Effects of introducing tescovine into pig feed on duodenal morphostructure

	Înălțime vilozități (μm)	Adâncime cripte (μm)	Raport (μm)
LM	202,2 ± 23,1 ^d	425,44 ± 21,8 ^b	0,47436 ± 0,04 ^d
LE1	225,4 ± 22,19 ^c	426,95 ± 22,0 ^b	0,52869 ± 0,05 ^c
LE2	293,6 ± 16,2 ^b	435,15 ± 20,64 ^{ab}	0,6753 ± 0,04 ^{bc}
LE3	356,6 ± 21,2 ^a	457,36 ± 29,83 ^a	0,7833 ± 0,08 ^a
LE4	299,3 ± 16,09 ^b	438,68 ± 21,09 ^{ab}	0,68257 ± 0,03 ^b
Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SD (n=10/grup). a, b, c, d - în cadrul unei coloane, valoriele care au același indice superior indică o diferență semnificativă (P < 0,05)			

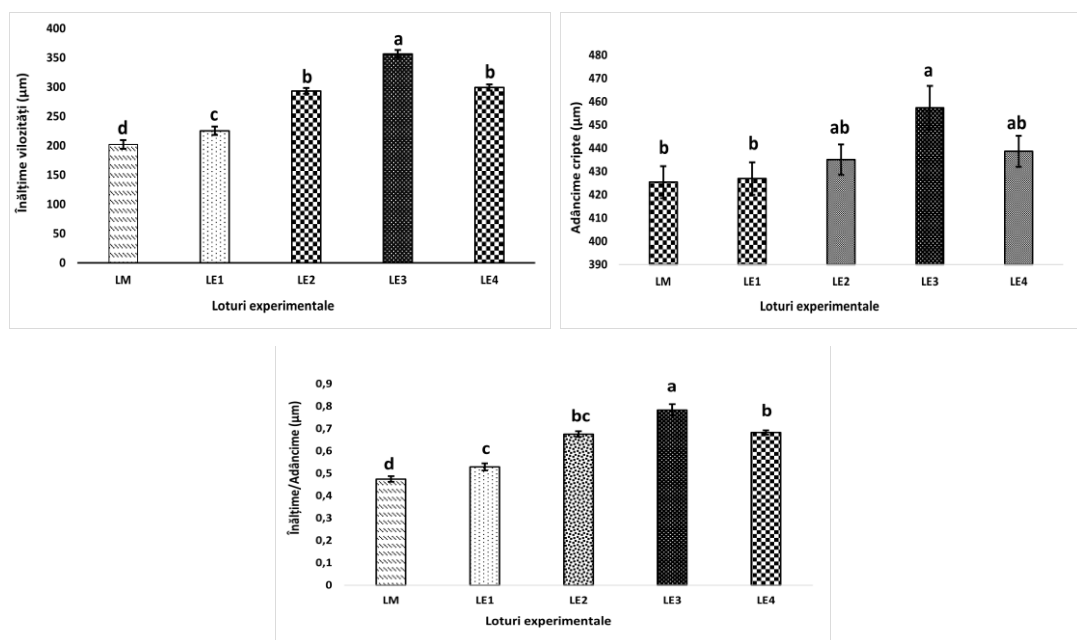


Figura 7.2. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfologiei duodenului. (A) Înălțimea vilozităților intestinale, (B) adâncimea criptelor intestinale, (C) raportul dintre înălțimea vilozităților intestinale și adâncimea criptelor, toate măsurate (μm) în fiecare grup. Valorile sunt medii ± SEM, n = 10. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit (P < 0,05). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4)

Figure 7.2. Effects of black grape tescovine polyphenols on duodenal morphology. (A) Intestinal villous height, (B) intestinal crypt depth, (C) ratio of intestinal villous height to crypt depth, all measured (μm) in each group. Values are means ± SEM, n = 10. Upper indecis within each group means significantly different (P < 0.05). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)

Din punct de vedere histologic, LE1 se aseamăna cu LM. Vilozitățile sunt joase, cu enterocite desprinse din epiteliu, cu numeroase celule limfoepiteliale în *lamina propria* a

mucoasei (Figura 7.3.). Doza de 1g/kg tescovină de struguri negri administrată LE1, a dus la o creștere semnificativă ($P < 0,05$) a înălțimii vilozităților intestinale față de LM cu 11,49%, ajungând la o valoare medie de $225,48 \pm 22,19\mu\text{m}$. În cazul adâncimii criptelor intestinale ($426,95 \pm 22,0$), nu s-au înregistrat modificări semnificative față de LM. LE1 a prezentat un raport mai mare cu 11,46% față de LM între înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor intestinale (Tabel 7.2.).

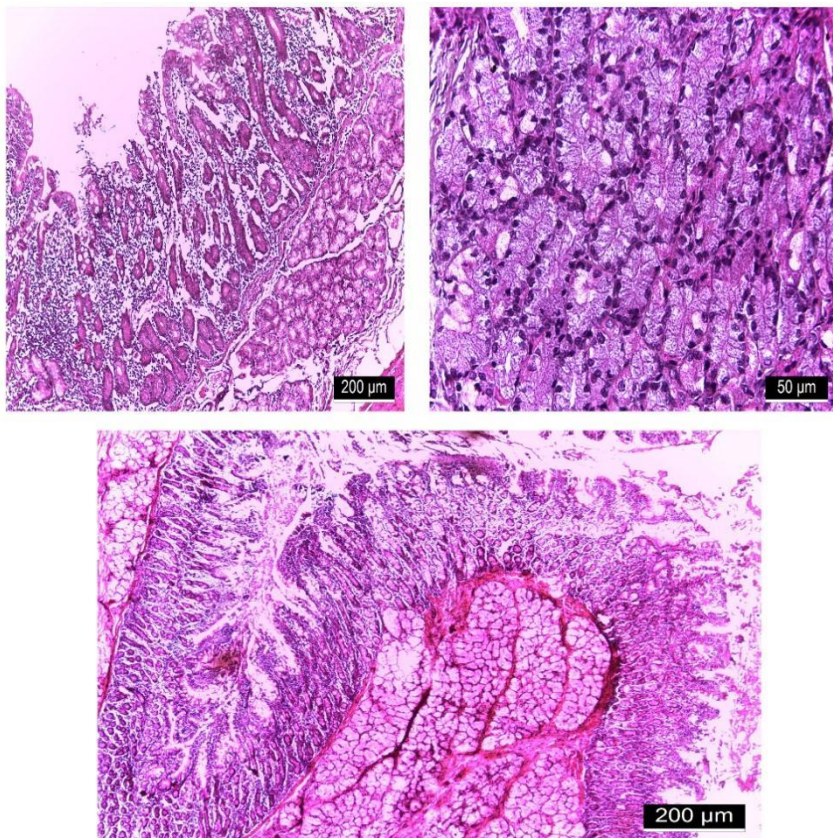


Figura 7.3. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1. (A, C) Aspect general al mucoasei și submucoasei duodenale. Este observată o infiltrație limfoepitelială în lamina propria a mucoasei. (B) Glande tubuloase simple alcătuiesc stratul glandular a mucoasei. Colorație HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)

Figure 7.3. Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 1. (A, C) General appearance of the duodenal mucosa and submucosa. Lymphoepithelial infiltration is seen in the lamina propria of the mucosa. (B) Simple tubular glands make up the glandular layer of the mucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)

Atât în epiteliul de la LE1 cât și de la LE2 au fost surprinse limfocite intraepiteliale. Lamina propria din zona periglandulară prezintă infiltrație limfo-plasmocitară (Figura 7.4.). Din punct de vedere statistic există o creștere semnificativă ($P < 0,05$) între înălțimea

vilozităților duodenale la LE2 și LM dar și între LE2 și LE1. Porcii din LE2 au vilozități intestinale mai înalte cu 45,18% față de cele de la LM și cu 30,22% față de cele de la LE1. Adâncimea criptelor intestinale sunt aproximativ egale între LM și LE1. Raportul dintre înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor la LE2 este semnificativ mai mare ($P < 0,05$) față de LM (Tabel 7.2.).

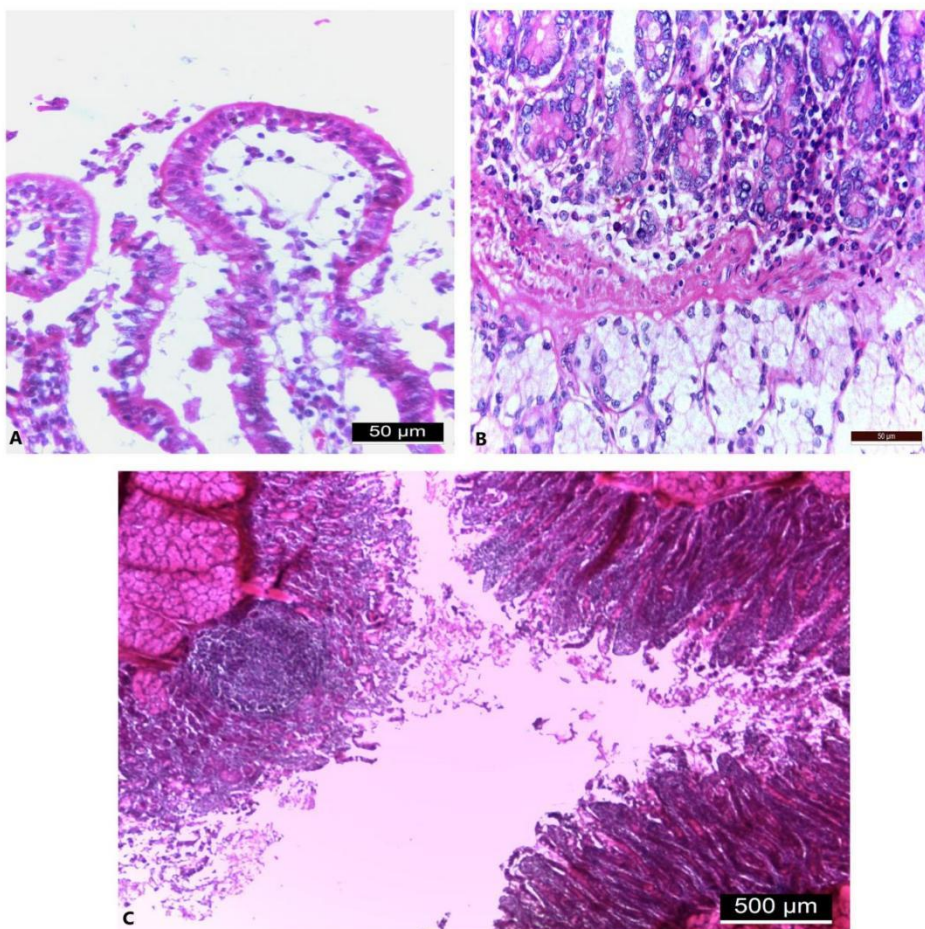


Figura 7.4. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2. (A) Vilozitate intestinală acoperită cu un epiteliu columnar cu platou striat. Sunt observate numeroase limfocite intraepiteliale. (B) Infiltrație limfoepitelială între glandele Lieberkühn. (C) Infiltrație limfoplasmocitară în mucoasă sub formă difuză a dar și organizată sub formă de limfonoduli. Colorație HEx400 (A, B), HEx100 (C) (Original)

Figure 7.4. Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 2. (A) Intestinal villi covered with a simple columnar epithelium. Numerous intraepithelial lymphocytes are observed. (B) Lymphoepithelial infiltration between the Lieberkühn glands. (C) Lymphoplasmacytic infiltration in the mucosa in the diffuse form of but also organized as lymphonoduli. HEx400 (A, B), HEx100 (C) staining (Original)

În urma adaosului de 10g/kg tescovină în hrana porcilor s-au obținut cele mai bune rezultate la nivel morfostructural. Duodenul de la LE3 prezintă vilozități intestinale înalte, cu

un diametru mai mare unde sunt regăsite fibre musculare netede ce provin din *muscularis mucosae*, vase de sânge și vase limfatice ce aparțin țesutului conjunctiv din *lamina propria*. Mucoasa prezintă numeroase pliuri laterale iar epitelul columnar are o rată de integritate mai mare. Mucoasa este mai groasă datorită acumulării în *lamina propria* a diferite populații limfoplasmocitare. Aceste celule se găsesc printe glandele Lieberkühn până în vârful vilozităților. Submucoasa este mai proeminentă datorită acumulării de limfonoduli, a căror dimensiuni pot trece de *muscularis mucosae*, îndeplinând un rol de barieră imunitară pentru peretele intestinal (Figura 7.5.).

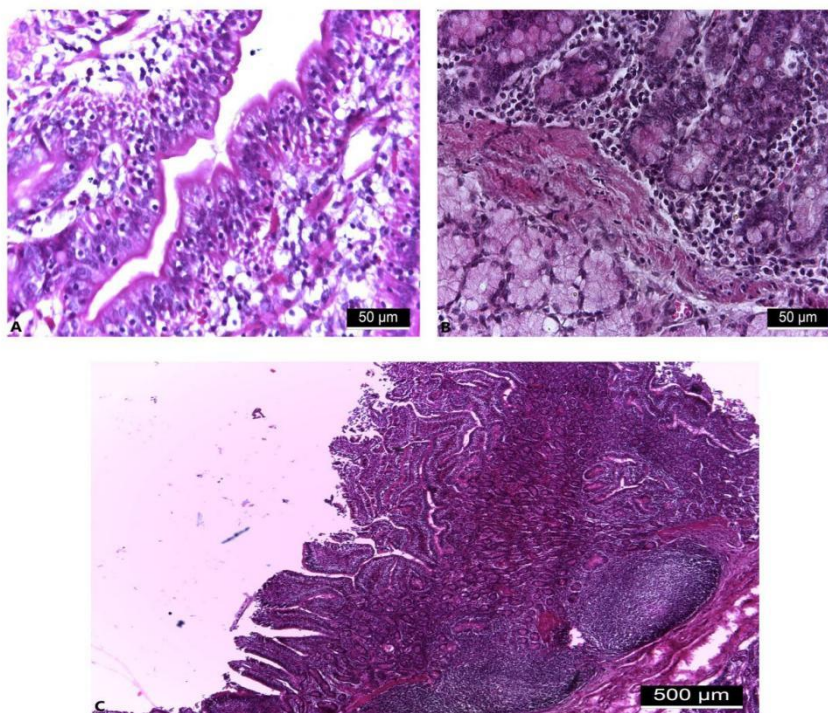


Figura 7.5. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3. (A) Vilozitate intestinală cu numeroase pliuri epiteliale laterale. (B) Infiltrație limfoplasmocitară în jurul glandele Lieberkühn. (C) Infiltrație limfoplasmocitară sub formă difuză în lamina propria și sub formă de limfonoduli în submucoasă . Colorație HEx400 (A, B), HEx100 (C) (Original)

Figure 7.5. Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 3. (A) Intestinal villus with numerous lateral epithelial folds. (B) Lymphoplasmacytic infiltration around the Lieberkühn glands. (C) Lymphocytic lymphoplasmacytic infiltration in diffuse form in the lamina propria and as lymph nodules in the submucosa. HEx400 (A, B), HEx100 (C) staining (Original)

LE3 a avut cele mai mari valori înregistrate pentru înălțimea vilozităților duodenale ($356,6 \pm 21,2\mu\text{m}$), adâncimea criptelor ($457,36 \pm 29,83\mu\text{m}$) dar și a raportului dintre cei doi factori ($0,7833 \pm 0,08\mu\text{m}$) (Tabel 7.2.). Din punct de vedere statistic, la LE3 s-au obținut

valori semnificativ mai mari față de LM dar și față de celelalte loturi experimentale (LE1, LE2 și LE4). Vilozițiile au lungimi semnificativ mai mari (76,33%) și un raport final între înălțimea vilozițiilor și adâncimea criptelor cu 65,13% mai mare decât cele înregistrate pentru LM ($P < 0,05$) (Tabel 7.2.).

În urma examinării secțiunilor din duoden ce provin de la porcii hrăniți cu 15g/kg tescovină (LE4), structura histologică este asemănătoare cu cea observată la LE2. Vilozițiile sunt lungi ($299,3 \pm 16,09\mu\text{m}$), cu un pliuri laterale și numeroase limfocite intraepiteliale (Figura 7.6.).

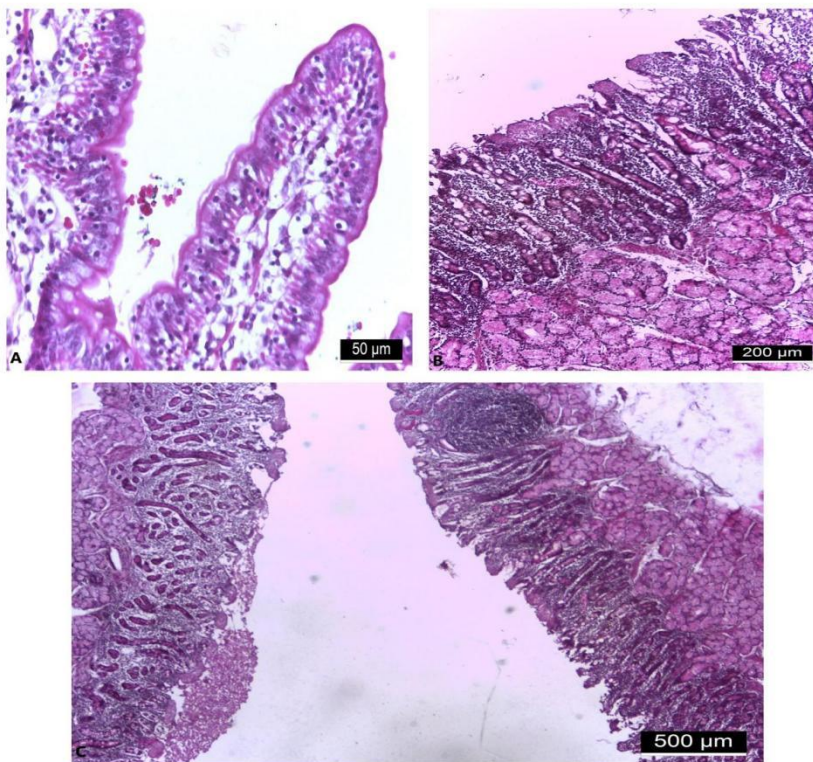


Figura 7.6. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4. (A) Vilozitate intestinală cu numeroase pliuri epiteliale laterale și limfocite intraepiteliale. (B) Infiltrație limfoplasmocitară abundentă în jurul stratului glandular al mucoasei. (C) Puțini limfonoduli prezenți în submucoasă. Colorație HEx400 (A, B), HEx100 (C) (Original)

Figure 7.6. Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 4. (A) Intestinal villus with numerous lateral epithelial folds and intraepithelial lymphocytes. (B) Abundant lymphoplasmacytic infiltration around the glandular layer of the mucosa. (C) Few lymph nodules present in the submucosa. HEx400 (A, B), HEx100 (C) staining (Original)

Din punct de vedere statistic, lungimea vilozițiilor a crescut cu 48% față de LM dar sunt mai mici decât cele de la LE3 cu 16,07%. De asemenea, și raportul dintre înălțimea vilozițiilor și adâncimea criptelor a crescut cu 43,89% față de LM și a scăzut cu 12,86% față

de LE3. Limfonodulii din submucoasă sunt într-un număr mai mic față de LE3, de asemenea și infiltrația limfoidă din mucoasă este mai puțină. Din rezultatele obținute pentru duoden, doza de tescovină de struguri recomandată ca adaos pentru hrana porcilor este de 10g/kg.

Structura histologică a jejunului în toate loturile experimentale este una normală, cu câteva diferențe în funcție de doza de tescovină utilizată în acest experiment.

În cazul LM, jejunul prezintă o morfologie clasică. Vilozitățile sunt mai scurte ($146,47 \pm 25,12\mu\text{m}$) decât la duoden, adâncimea criptelor măsoară $380,04 \pm 24\mu\text{m}$, iar raportul dintre cele două (înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor) are valoarea de $0,38 \pm 0,05\mu\text{m}$. Specific jejunului este lipsa glandelor sero-mucoase din submucoasă și înlocuirea lor cu un țesut limfoid asociat mucoasei intestinale, organizat în limfonoduli. Aceste aglomerații limfoide au diferite dimensiuni și stadii de evoluție în funcție de reactivitatea sistemului imunitar intestinal (Figura 7.7.). Dimensiunile limfonodulilor din submucoasă au fost obținute în urma măsurării lungimii și a lățimii, obținându-se pentru LM următoarele valori: $300 \pm 32,1\mu\text{m}/245 \pm 29,78\mu\text{m}$ (Tabel 7.3.).

Tabel 7.3.

Efectele introducerii tescovinei în hrana porcilor asupra morfostructurii jejunale

Table 7.3.

Effects of introducing tescovine into pig feed on jejunal morphostructure

	Înălțime vilozități (μm)	Adâncime cripte (μm)	Raport	Dimensiune limfonoduli	
				Lungime (μm)	Lățime (μm)
LM	$146,47 \pm 25,12^d$	$380,04 \pm 24,11^c$	$0,38 \pm 0,05^c$	$300 \pm 32,1^e$	$245 \pm 29,78^d$
LE1	$149,77 \pm 25,58^d$	$382,82 \pm 25,80^c$	$0,39 \pm 0,065^c$	$407,24 \pm 18,67^d$	$250,37 \pm 16,78^d$
LE2	$233,48 \pm 21,91^c$	$400,94 \pm 21,84^b$	$0,58 \pm 0,064^b$	$655,09 \pm 19,83^b$	$383,36 \pm 19,57^b$
LE3	$325,38 \pm 23,42^a$	$445,4 \pm 26,97^a$	$0,73 \pm 0,046^a$	$793,71 \pm 29,28^a$	$461,25 \pm 27,26^a$
LE4	$270 \pm 11,56^b$	$430,89 \pm 19,79^a$	$0,62 \pm 0,033^b$	$620,95 \pm 21,68^c$	$360,63 \pm 17,46^c$
Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD (n = 10/grup). a, b, c, d, e - în cadrul unei coloane, valorile care au același indice superior indică o diferență semnificativă ($P < 0,05$)					

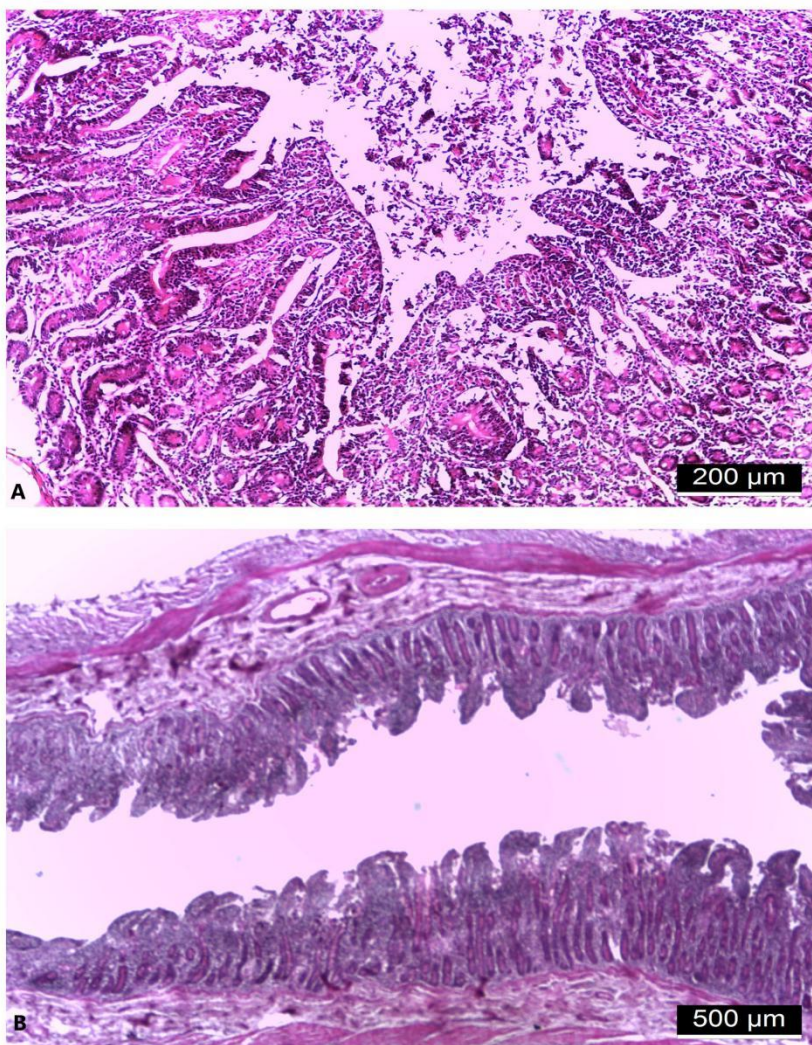


Figura 7.7. Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot martor. (A) Mucoasa alcătuită din vilozități intestinale, lamina propria, glande tubuloase simple și muscularis mucosae. (B) Compoziția peretelui jejunal: mucoasă, submucoasă, musculoasă și seroasă. Colorație HEx400 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.7. Pietrain pig jejunum. Control group. (A) Mucosa composed of intestinal villi, lamina propria, simple tubular glands and muscularis mucosae. (B) Composition of the jejunal wall: mucosa, submucosa, muscularis, and serosa. Staining HEx400 (A), HEx100 (B) (Original)

Doza de 1g/kg (LE1) nu a adus modificări structurale semnificative față de LM (Figura 7.8.) și (Figura 7.9.).

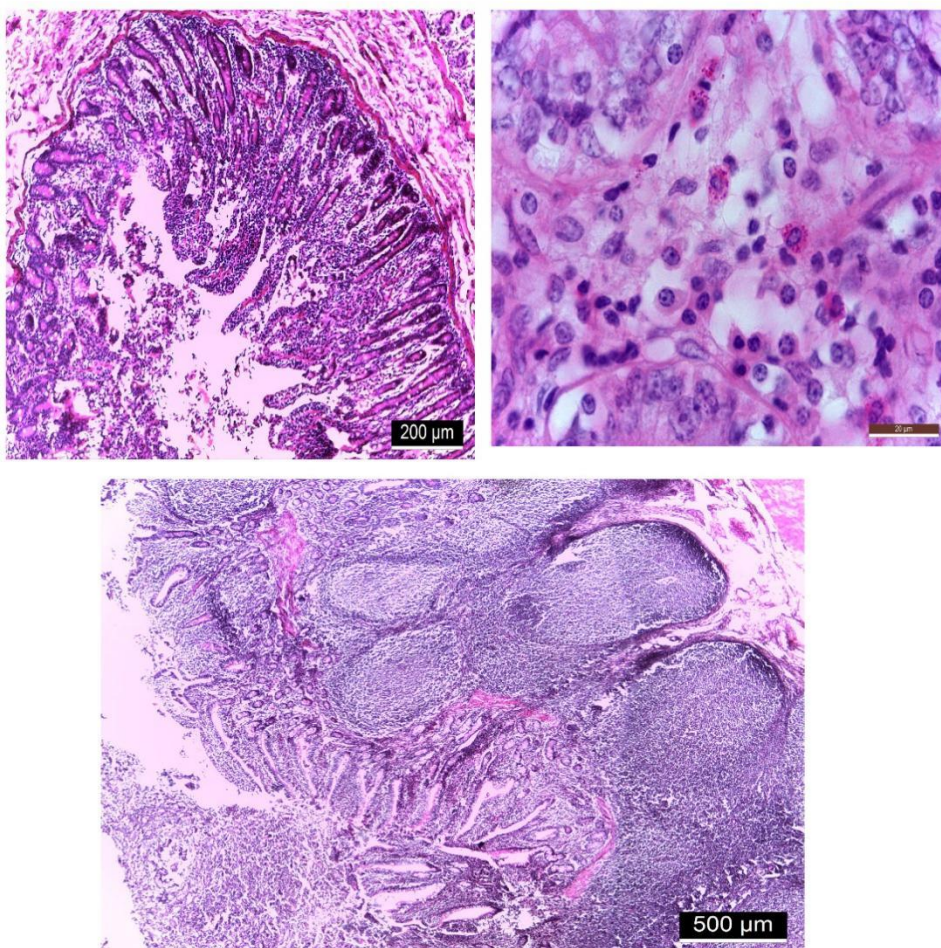


Figura 7.8. Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1. (A) Structura peretelui jejunal: mucoasă, submucoasă, musculară și seroasă. (B) Infiltrație limfoidă în lamina propria. (C) Plăcile Peyer în submucoasă. Colorație HEx100 (A, C), HEx1000 (B) (Original)

Figure 7.8. Pietrain pig jejunum. Experimental group 1. (A) Structure of the jejunal wall: mucosal, submucosal, muscular and serosal. (B) Lymphoid infiltration in the lamina propria. (C) Peyer's plaques in submucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx1000 (B) (Original)

LE2, care a fost hrănit cu un adous de 5% în furaj, a avut rezultate mai bune decât LM și LE1 la nivelul jejunului. Mucoasa a fost mai groasă datorită faptului că înălțimea vilozităților a crescut 59,4% față de LM și cu 55,89% față de LE1 iar în lamina propria sunt infiltrații limfoide (Figura 7.11.). Adâncimea criptelor intestinale a fost semnificativ mai mare ($P < 0,05$) decât LM și LE1, iar raportul dintre înălțime și adâncime a fost mai mare cu 52,03% față de LM și cu 49,13% decât LE1. În submucoasă sunt observați numeroși limfonoduli reactivi cu media diametrului egală cu $655,09/383,36 \pm 19,83/19,57\mu\text{m}$ (Tabel 7.3.).

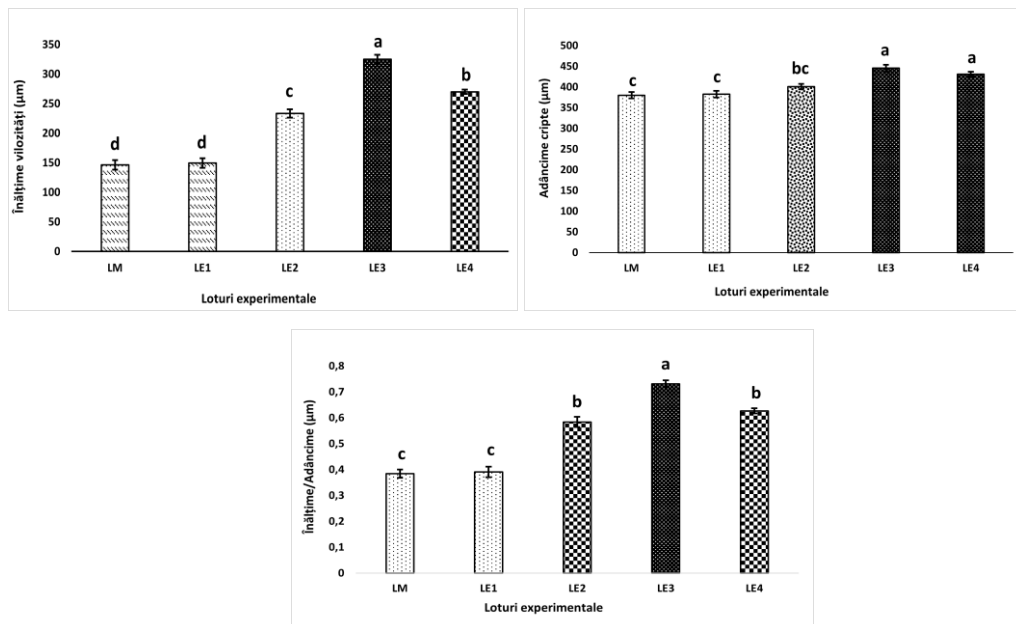


Figura 7.9. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfologiei jejunului. (A) Înălțimea vilozităților intestinale, (B) adâncimea criptelor intestinale, (C) raportul dintre înălțimea vilozităților intestinale și adâncimea criptelor, toate măsurate (μm) în fiecare grup. Valorile sunt medii $\pm$ SEM, $n = 10$. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4)

Figure 7.9. Effects of black grape tescovine polyphenols on jejunal morphology. (A) Intestinal villous height, (B) intestinal crypt depth, (C) ratio of intestinal villous height to crypt depth, all measured (μm) in each group. Values are means $\pm$ SEM, $n = 10$. Upper indecis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)

Grosimea peretelui jejunul la LE3 este mult mai mare față de restul loturilor experimentale datorită faptului că atât mucoasa cât și submucoasa au dimensiuni mai mari. Reactivitatea mucoasei la doza de 10g/kg tescovină de struguri negri este descrisă de faptul că: vilozitățile au cea mai mare înălțime dintre toate loturile experimentale ($325,38 \pm 23,42\mu\text{m}$) dar și de o proliferare într-o rată mai mare a celulelor în glandele Lieberkühn ($445,4 \pm 26,97\mu\text{m}$) (Tabel 7.3.).

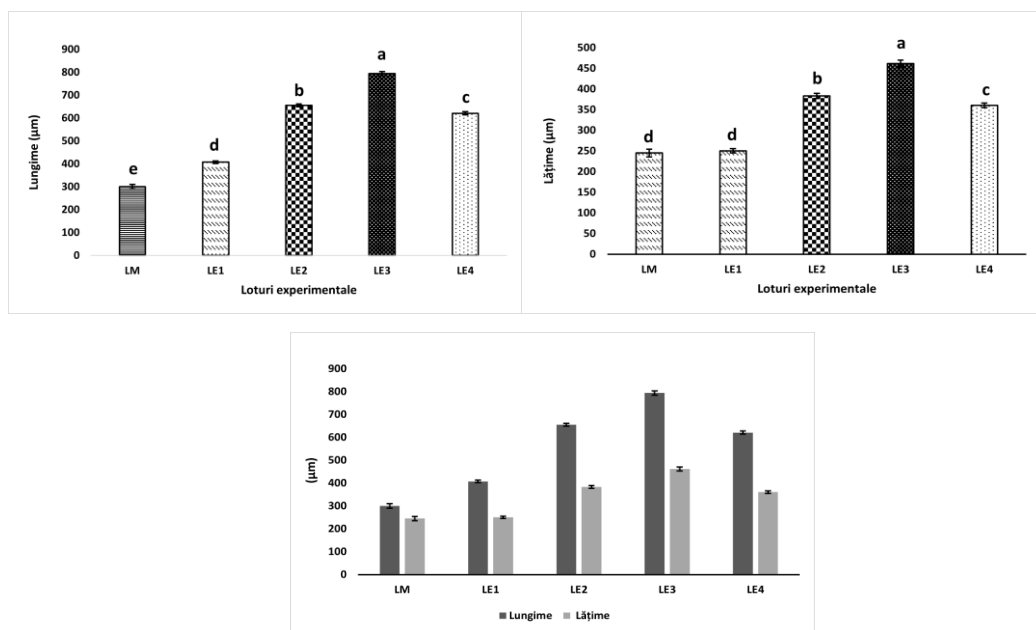


Figura 7.10. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra limfonodurilor din submucoasa jejunului. (A) Lungimea limfonodurilor, (B) lățimea limfonodurilor, (C) dimensiunea finală a limfonodurilor în fiecare grup. Valorile sunt calculate în μm și exprimate în medii $\pm$ SEM, $n = 10$. Indecel superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4)

Figure 7.10. Effects of black grape tescovine polyphenols on lymph nodes in jejunal submucosa. (A) Lymph node length, (B) lymph node width, (C) final size of lymph nodes in each group. Values are calculated in μm and expressed as means $\pm$ SEM, $n = 10$. Upper indicis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)

Din punct de vede statistic s-a obținut o diferență semnificațivă între LE3 și restul loturilor experimentale (Figura 7.9.). Înălțimea vilozităților a fost mai mare la LE3 cu 122,15% față de LM, cu 117,26% față de LE1, cu 39,36% față de LE2 și cu 17,02% față de LE4. Submucoasa găzduiește țesutul limfoid asociat mucoasei organizat în noduli limfoizi întinși sub forma plăcilor Peyer (Figura 7.12.). Acești limfonoduli au fost măsurați și au cea mai mare dimensiune față de celelalte loturi experimentale ($793,71 \pm 29,28\mu\text{m}/461,25 \pm 27,26\mu\text{m}$).

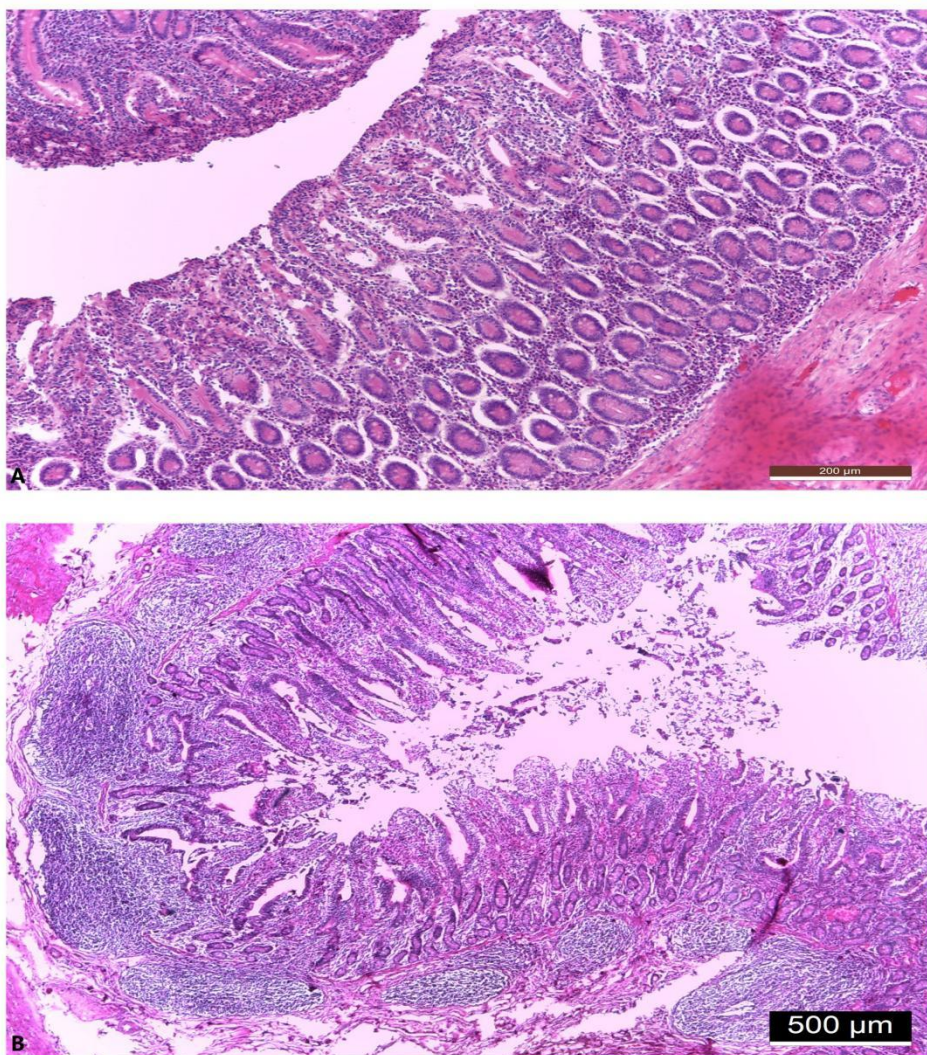


Figura 7.11. Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2. (A) Stratul glandular din mucoasa jejunului prezintă o infiltrație limfoplasmocitară. (B) Numeroși limfonoduli în submucoasă ce fac parte din plăcile Peyer. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.11. Pietrain pig jejunum. Experimental group 2. (A) The glandular layer in the mucosa of the jejunum shows lymphoplasmacytic infiltration. (B) Numerous lymph nodes in the submucosa forming part of Peyer's plaques. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

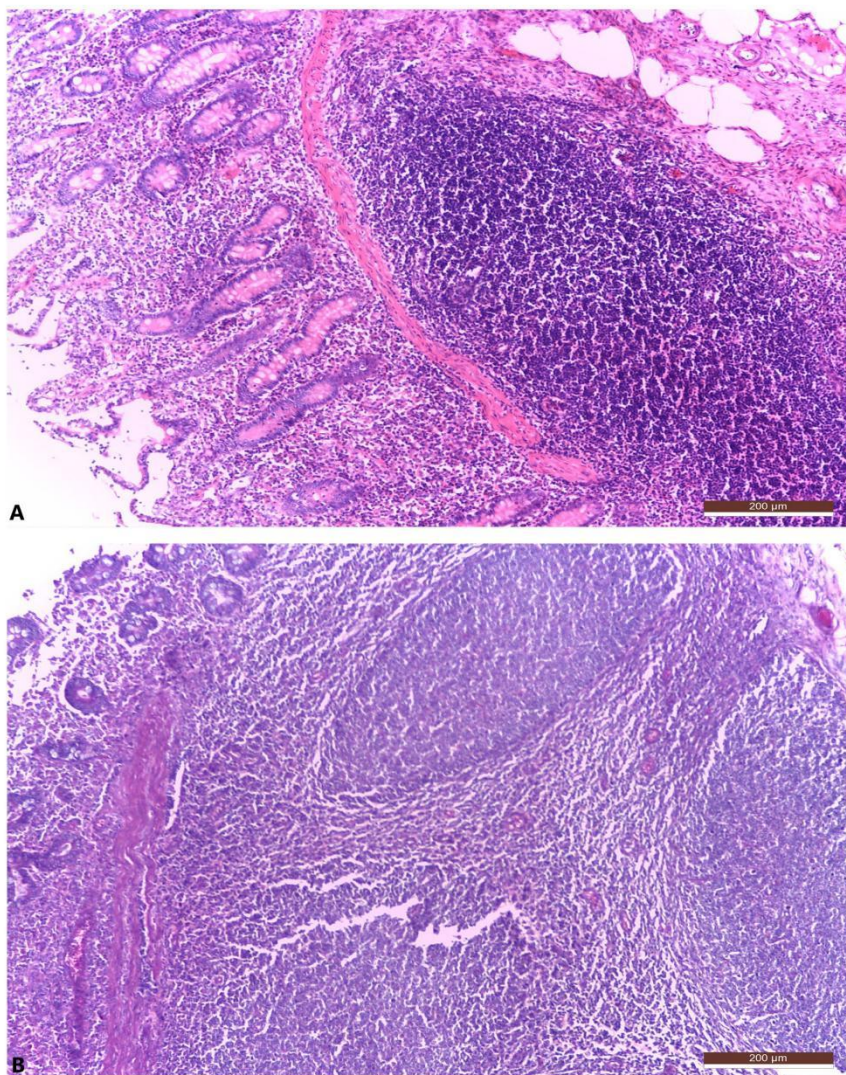


Figura 7.12. Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3. (A) Structura histologică a mucoasei și submucoasei jejunului. Glandele Lieberkühn sunt lungi. Imediat sub muscularis mucosae se găsesc noduli limfoizi. (B) Țesutul limfoid din submucoasă este reprezentat de nodulilimfoizi cu diametrul mare.

Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.12. Pietrain pig jejunum. Experimental group 3. (A) Histologic structure of the mucosa and submucosa of the jejunum. The Lieberkühn glands are long. Immediately below the muscularis mucosae are lymphoid nodules. (B) Lymphoid tissue in the submucosa is represented by large-diameter lymphoid noduli. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

LE4 a primit în furaj 15g/kg tescovină din struguri negri. În urma analizei morfometrice, rezultatele sunt mai bune față de LM, LE1 (1g/kg) și LE2 (5g/kg), dar inferioare LE3 (10g/kg). Deși vilozitățile sunt înalte ($270 \pm 11,56\mu\text{m}$), în polul apical, epiteliul este desprins pe zone întinse, lamina propria este invadată de populații limfoepiteliale iar

adâncimea criptelor este mai mică decât la LE3 (Figura 7.13.). Limfonodulii din cadrul plăcilor Peyer au în medie dimensiunea mai mică decât cele de la LE2 și LE3 (Figura 7.10.). Din rezultatele obținute pentru jejun, doza de tescovină de struguri recomandată ca adaos pentru hrana porcilor este de 10g/kg.

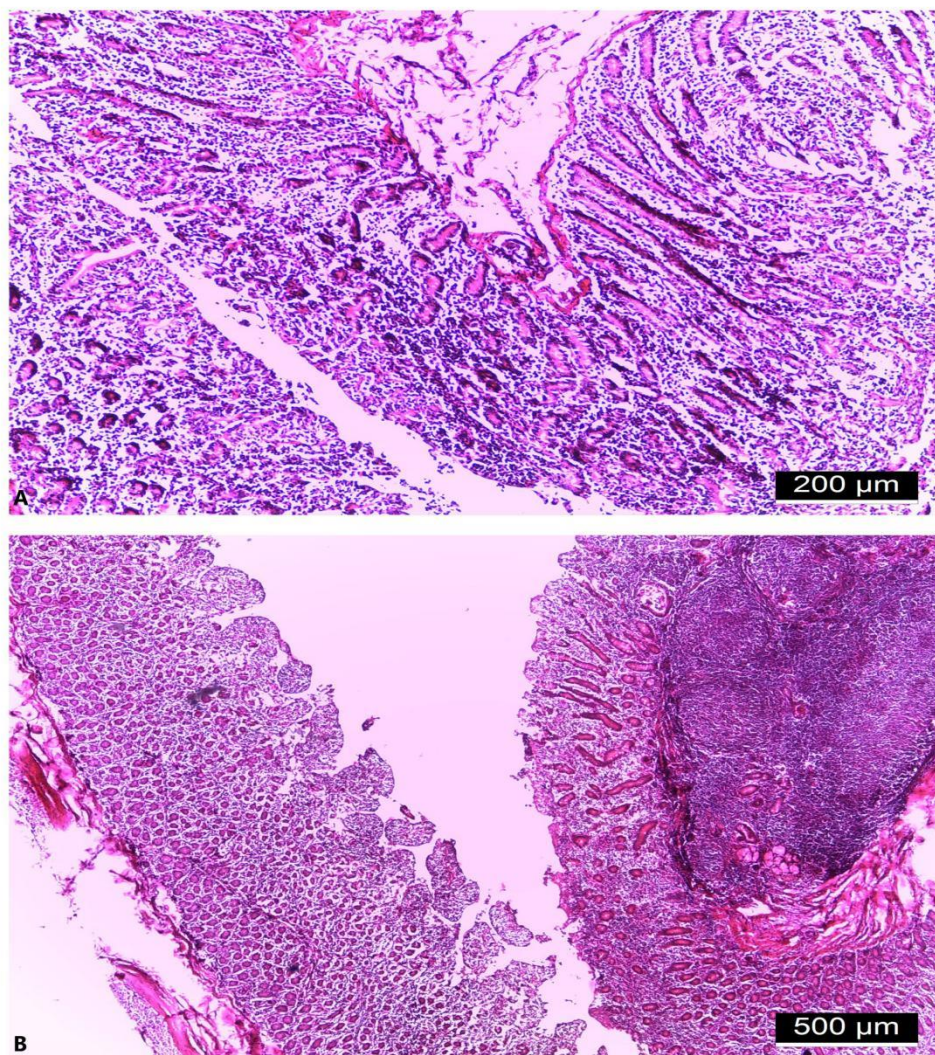


Figura 7.13. Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4. (A) Infiltrație limfoepitelială în lamina propria a mucoasei. (B) Aglomerări de nodulilimfoizi în submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)
 Figure 7.13. Pietrain pig jejunum. Experimental group 4. (A) Lymphoepithelial infiltration in the lamina propria of the mucosa. (B) Agglomerations of noduloepithelioepithelioid cells in the submucosa. HEx100 staining (A), HEx100 (B) (Original)

Ileonul a fost studiat pentru reactivitatea țesutului limfoid asocit mucoasei intestinale la polifenolii din tescovina de struguri negri. Pentru LM, morfostructura este una clasică. Vilozițiile sunt cele mai mici din tot intestinul subțire ($125,22 \pm 19,18\mu\text{m}$), în cadrul epiteliului sunt mai multe celule caliciforme care iau naștere în glandele tubuloase simple ($393,44 \pm 26,68\mu\text{m}$), iar din loc în loc, muscularis mucosae este întreruptă de plăcile Peyer care ajung până în lumenul intestinal (Figura 7.14.).

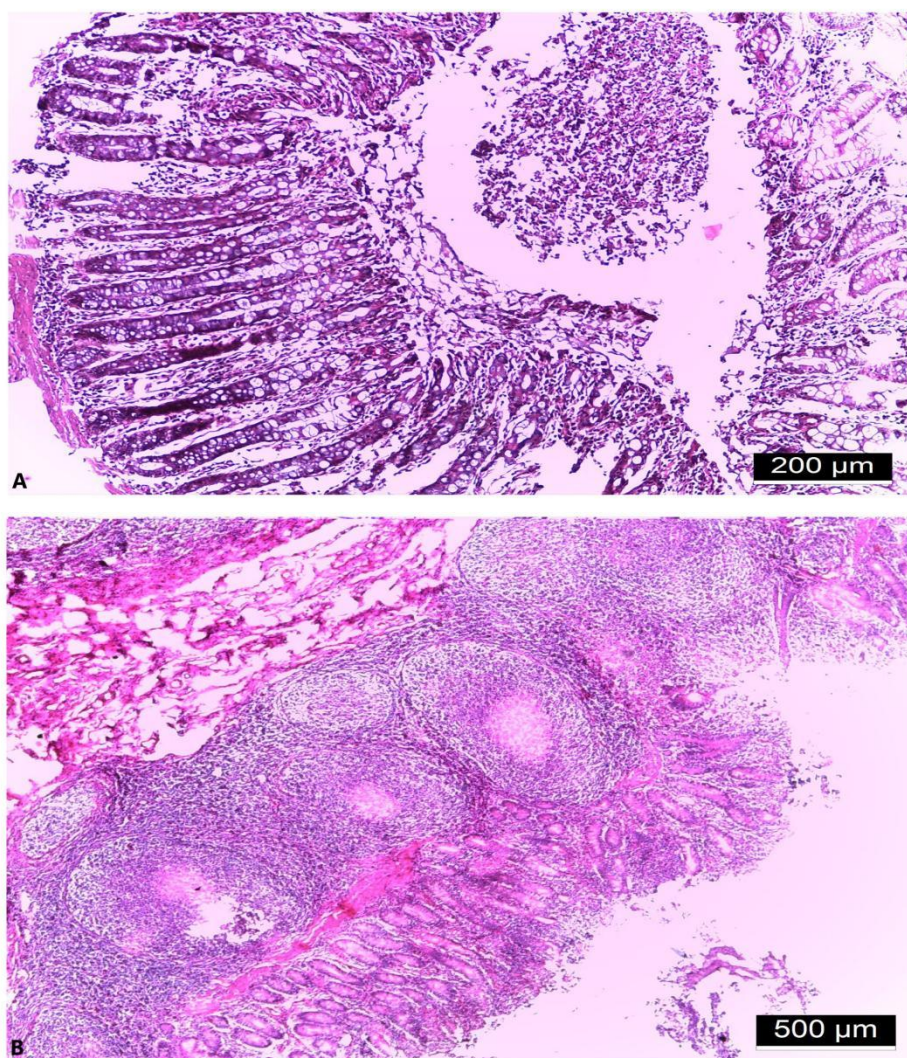


Figura 7.14. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot martor. (A) Infiltrație limfoepitelială la baza glandelor. Epiteliul desprins din vârful vilozităților. (B) Aglomerări de limfonoduli reactivi în submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.14. Pietrain pig Ileum. Control group. (A) Lymphoepithelial infiltration at the base of the glands. Epithelium detached from the apex of the villi. (B) Agglomerations of reactive lymphoepithelioid nodules in the submucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Tabel 7.4.

Efectele introducerii tescovinei în hrana porcilor asupra morfostructurii ileon

Table 7.4.

Effects of introducing tescovine into pig feed on ileum morphostructure

	Înălțime vilozități (μm)	Adâncime cripte (μm)	Raport	Dimensiune limfonoduli	
				Lungime (μm)	Lățime (μm)
LM	125,22 ± 19,18 ^b	393,44 ± 26,68	0,31 ± 0,04 ^b	213,07 ± 20,38 ^e	156 ± 19,81 ^d
LE1	128,04 ± 19,95 ^b	394,83 ± 26,03	0,32 ± 0,04 ^{bc}	323,7 ± 44,13 ^d	245 ± 29,78 ^d
LE2	140,28 ± 18,95 ^{ab}	411,25 ± 34,27	0,34 ± 0,05 ^{abc}	655,09 ± 19,83 ^b	360,63 ± 17,46 ^b
LE3	156,45 ± 19,22 ^a	420,62 ± 29,14	0,37 ± 0,03 ^a	954,31 ± 32,17 ^a	487,36 ± 28,56 ^a
LE4	150,04 ± 14,45 ^a	412,11 ± 34,30	0,36 ± 0,03 ^a	520,88/ ± 20,53 ^c	355,63 ± 14,22 ^c
Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SD (n = 10/grup). a, b, c, d, e - în cadrul unei coloane, valorile care au același indice superior indică o diferență semnificativă (P < 0,05)					

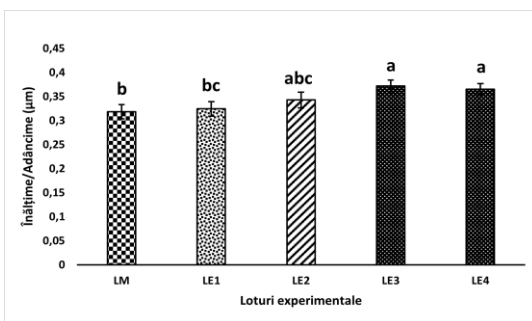
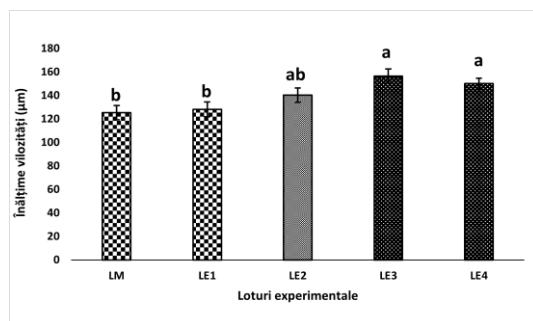


Figura 7.15. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfologiei ileonului. (A) Înălțimea vilozităților intestinale, (B) raportul dintre înălțimea vilozităților intestinale și adâncimea criptelor, toate măsurate (μm) în fiecare grup. Valorile sunt medii ± SEM, n = 10. Indecel superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit (P < 0,05). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4)

Figure 7.15. Effects of black grape tescovine polyphenols on ileum morphology. (A) Height of intestinal villi, (B) ratio of intestinal villous height to crypt depth, all measured (μm) in each group. Values are means ± SEM, n = 10. Upper indicis within each group means significantly different (P < 0.05). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)

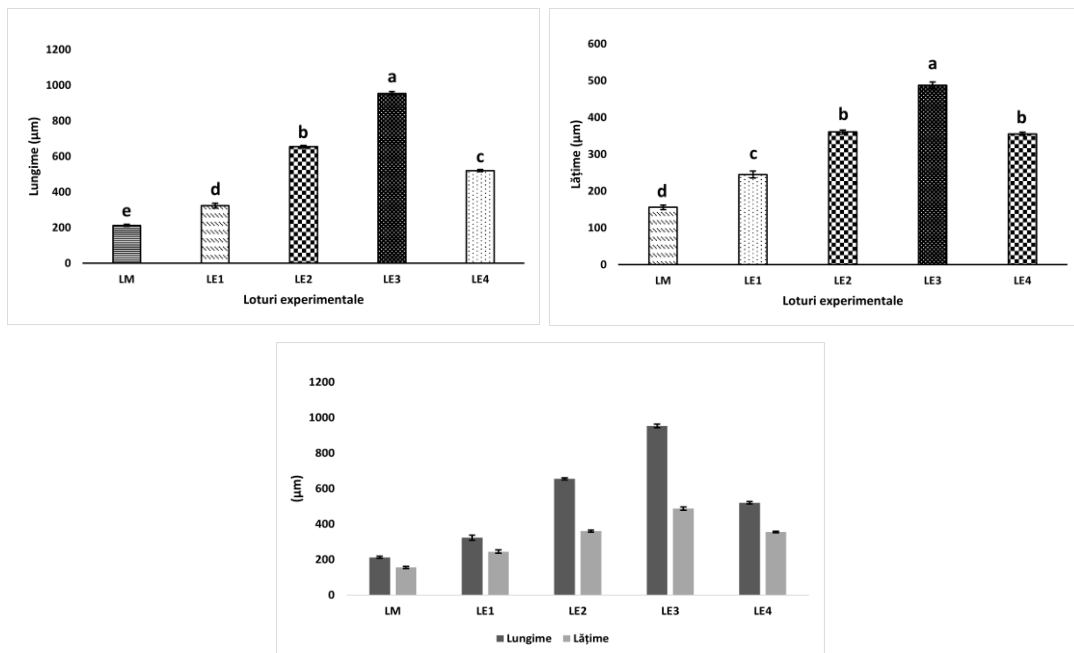


Figura 7.16. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra limfonodurilor din submucoasa ileonului. (A) Lungimea limfonodurilor, (B) lățimea limfonodurilor, (C) dimensiunea finală a limfonodurilor în fiecare grup. Valorile sunt calculate în μm și exprimate în medii $\pm$ SEM, $n = 10$. Indecel superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4)

Figure 7.16. Effects of black grape tescovine polyphenols on lymph nodes in ileum submucosa. (A) Lymph node length, (B) lymph node width, (C) final size of lymph nodes in each group. Values are calculated in μm and expressed as means $\pm$ SEM, $n = 10$. Upper indicis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)

Doza de 1 g/kg (LE1) de tescovină de struguri negri nu a adus modificări semnificative față de LM (Figura 7.15 .) și (Tabel 7.4.).

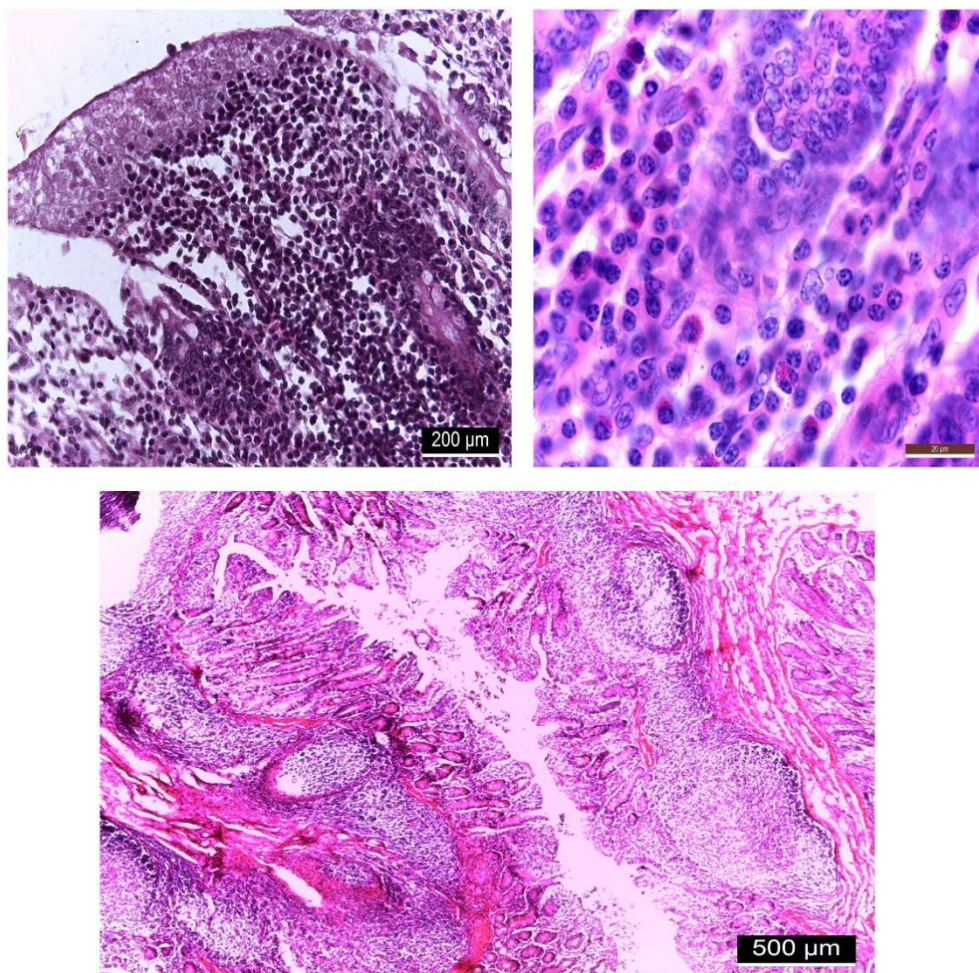


Figura 7.17. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1. (A, B) Infiltrație limfoepitelială în lamina propria, în jurul glandelor Lieberkühn. (C) Organizarea țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale sub forma plăcilor Peyer. Colorație HEx400 (A), HEx1000 (B), HEx100 (C) (Original)

Figure 7.17. Pietrain pig ileum. Experimental group 1. (A, B) Lymphoepithelial infiltration in the lamina propria around the Lieberkühn glands. (C) Organization of intestinal mucosa-associated lymphoid tissue as Peyer's plaques. Staining HEx400 (A), HEx1000 (B), HEx100 (C) (Original)

La LE2 (10g/kg tescovină), atât lungimea vilozităților ($140,28 \pm 18,95\mu\text{m}$) cât și lungimea criptelor intestinale ($411,25 \pm 34,27\mu\text{m}$) sunt mai mari față de LM și LE1 dar fără semnificație statistică, iar raportul dintre cele două s-a menținut constant ($0,34 \pm 0,05\mu\text{m}$) (Figura 8.18.). În submucoasă au fost măsurați limfonoduli (Figura 7.16.), care s-au dovedit din punct de vedere statistic, mai mari decât cei de la LM și LE1. În medie, dimesiunea lor este egal cu $655,09 \pm 19,83\mu\text{m} / 360,63 \pm 17,46\mu\text{m}$ (Tabel 7.4.).

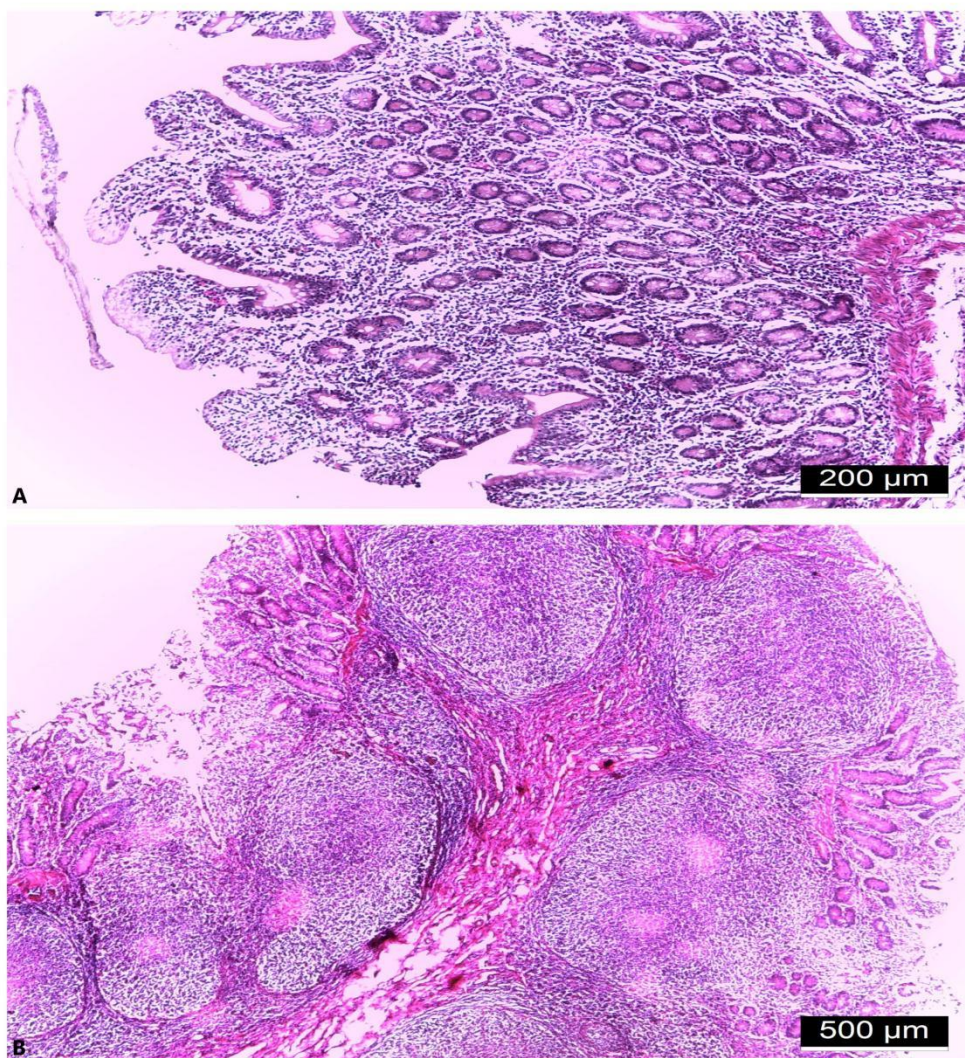


Figura 7.18. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2. (A) Mucoasă ileonului alcătuită din muscularis mucosae, glande Lieberkühn, lamina propria și vilozități acoperite de un epitelu columnar cu platou striat. (B) Aglomerări de limfonoduli reactivi în submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.18. Pietrain pig ileum. Experimental group 2. (A) Mucosa of the ileum consisting of muscularis mucosae, Lieberkühn glands, lamina propria and villi covered by a simple columnar epithelium. (B) Agglomerations of reactive lymph nodes in the submucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Polifenolii din strugurii negri au avut cele mai bune acțiuni asupra LE3 care a avut în dietă 10g de tescovină omogenizată în 100 g furaj. Vilozitățile intestinale sunt cele mai lungi ($156,45 \pm 19,22\mu\text{m}$) dintre toate loturile experimentale, cu diferențe semnificativ mai mari între LE3 față de LM și LE1 (Figura 7.15.). Vilozitățile de la LE3 sunt mai mari cu 24,94% față de LM și cu 22,19% față de LE1. În cadrul criptelor intestinale sunt vizibile mai multe celule caliciforme (Figura 7.19.), lungimea totală a criptelor fiind și ea cea mai mare dintre

toate loturile experimentale ($420,62 \pm 29,14\mu\text{m}$). Plăcile Peyer sunt bine organizate în submucoasă (Figura 7.19.), cu cei mai mari limfonoduli măsurați la toate loturile experimentale, media dimensiunii lor fiind egală cu $954,31 \pm 32,17/487,36 \pm 28,56\mu\text{m}$ (Tabel 7.4.).

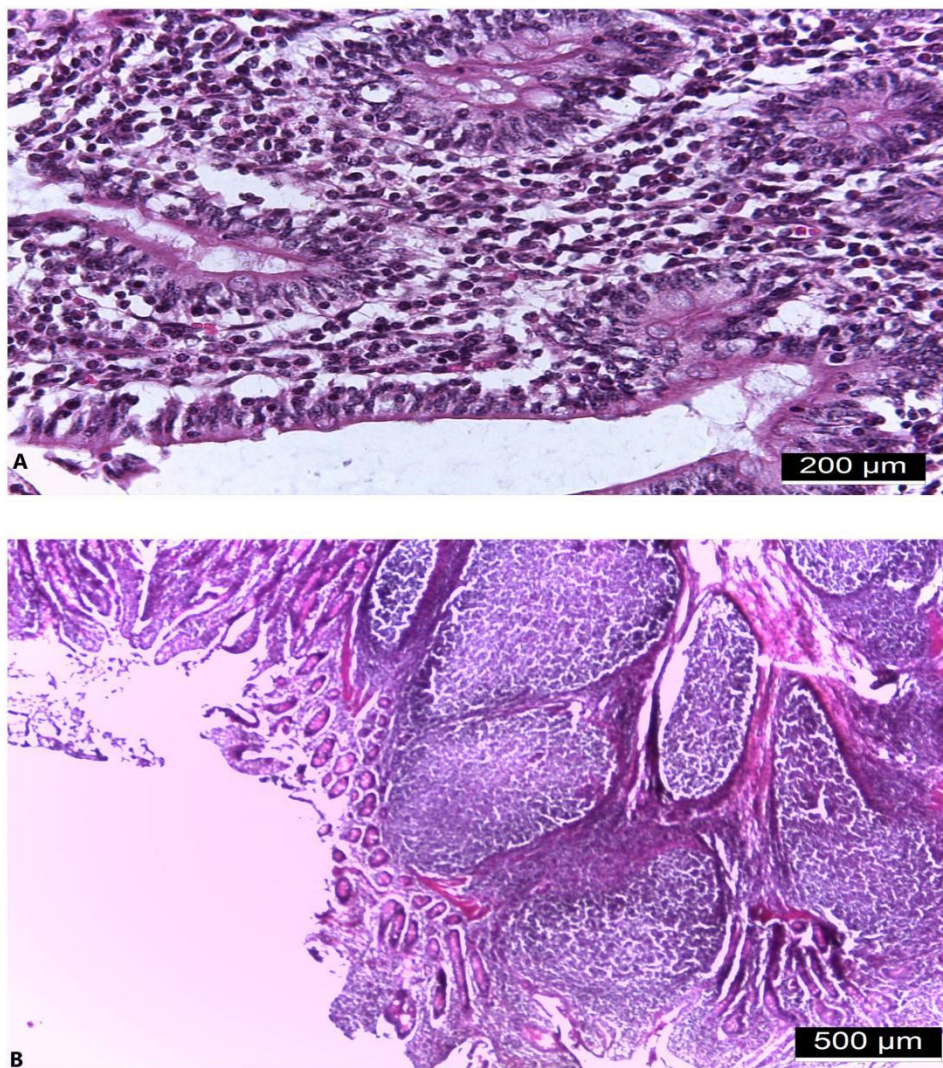


Figura 7.19. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3. (A) Glandele Lieberkühn sunt alcătuite din enterocite, celule caliciforme și celule neuroendocrine. Glandele sunt înconjurate de infiltrație limfoepitelială. (B) Plăcile Peyer alcătuite din limfonoduli mari ce trec de mucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.19. Pietrain pig ileum. Experimental group 3. (A) Lieberkühn's glands consist of enterocytes, goblet cells and neuroendocrine cells. The glands are surrounded by lymphoepithelial infiltrate. (B) Peyer's plaques composed of large lymphoid nodules crossing the mucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Ileonul de la LE4, la fel ca și celelalte segmente intestinale studiate, înregistrează indici morfostructurali mai buni decât LM, LE1 și LE2, dar inferiori LE3. Doza de 15g de tescovină în 100 kg de furaj a dus la obținerea unor vilozități semificativ mai mari ($18,62\%$) față de LM, înălțimea lor fiind egală în medie cu $150,04 \pm 14,45\mu\text{m}$. Adâncimea criptelor a fost numeric mai mare față de restul loturilor experimentale ($412,11 \pm 34,30\mu\text{m}$). Limfonodulii din submucoasă au avut în medie dimensiuni egale cu $520,88 \pm 20,53/355,63 \pm 14,22\mu\text{m}$ (Figura 7.20.), de asemenea, valori mai mari decât restul loturilor experimentale dar inferioare LE3.

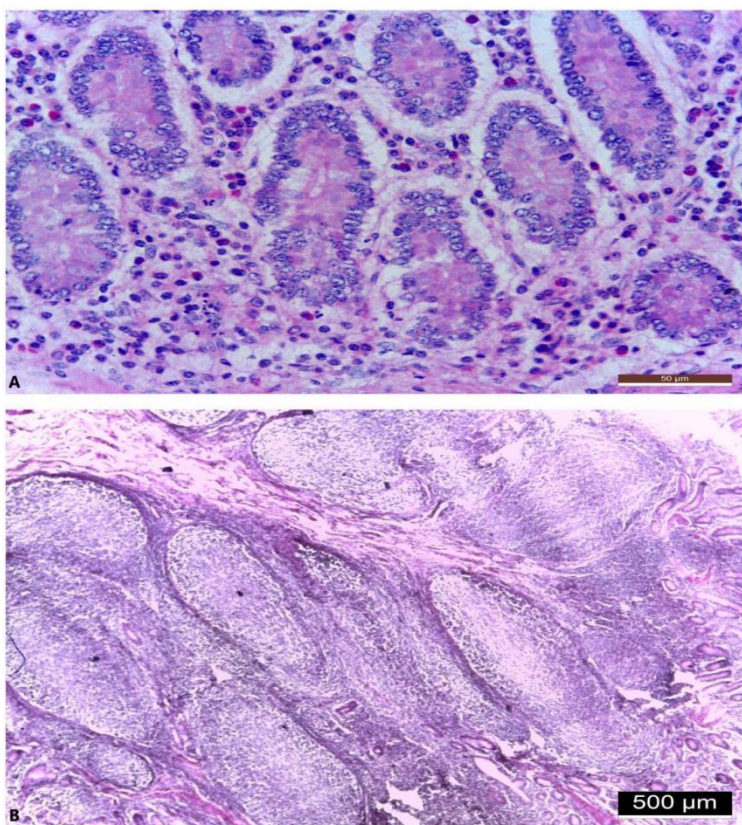


Figura 7.20. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4 (A) Glandele Lieberkühn sunt înconjugate de infiltrație limfoepitelială. (B) Plăcile Peyer sunt alcătuite din numeroși limfonoduli. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.20. Pietrain pig ileum. Experimental group 4 (A) Lieberkühn's glands are surrounded by lymphoepithelial infiltration. (B) Peyer's plaques are composed of numerous lymph nodes. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfostructurii intestinului subțire au fost direct proporționale cu dozele administrate. Valorile pentru

înălțimea vilozităților, adâncimea criptelor intestinale și raportul dintre ele, au crescut progresiv de la 1g/kg până la doza de 10g/kg. Deși, doza 15g/kg are un conținut mai ridicat de polifenoli, s-a preconizat ca va avea, indirect, și o influență mai bună asupra intestinului. Se pare că LE4 a stagnat evoluția, chiar obținându-se rezultate inferioare față de LE3. De aici, se deduce faptul că doza optimă de tescovină de struguri negri care poate fi introdusă în dieta porcilor este de 10g/kg, așa cum a fost administrată LE3.

Cecumul la porc este cunoscut pentru un țesut limfoid foarte dezvoltat, fiind reprezentat atât de infiltrații limfoide difuze, dar în special de organizarea sa în limfonoduli în submucoasă, aspect întâlnit la LM (Figura 7.21.). Vilozitățile intestinale nu sunt prezente, în schimb glandele Lieberkühn sunt mai mari fiind populate de mai puține enterocite și mai multe celule secretoare de mucus.

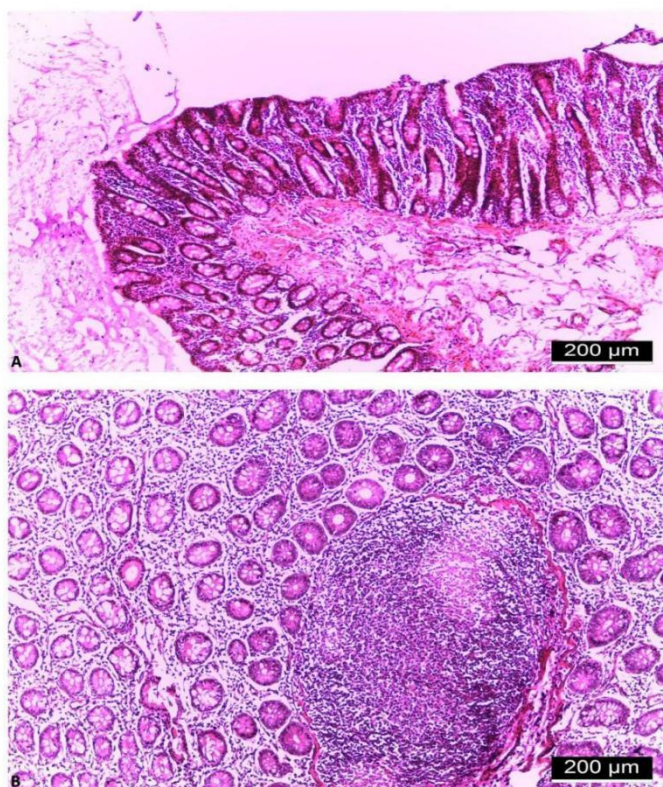


Figura 7.21. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot martor (A) Glandele Lieberkühn sunt joase. Nu sunt prezente vilozități intestinale. (B) Plăcile Peyer sunt localizați în submucoasă, fiind despărțiți de mucoasă de muscularis mucosae. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.21. Cecum of Pietrain pig. Control group (A) Lieberkühn's glands are low. No intestinal villi are present. (B) Peyer's patches are localized in the submucosa, being separated from the mucosa by muscularis mucosae. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

LE1 a fost hrănit cu doza de 1g/kg tescovină de struguri negri. În urma analizei histologice a cecumului la LE1 nu s-au găsit deosebiri față de LM. Mucoasa este asemănătoare la grosime, având în compoziție aceleași glande Lieberkühn joase dar cu un diametru mai mare, același epiteliu columnar cu margine în perie și cu predominanța celulelor caliciforme în detrimentul celulelor absorbtive (Figura 7.22.).

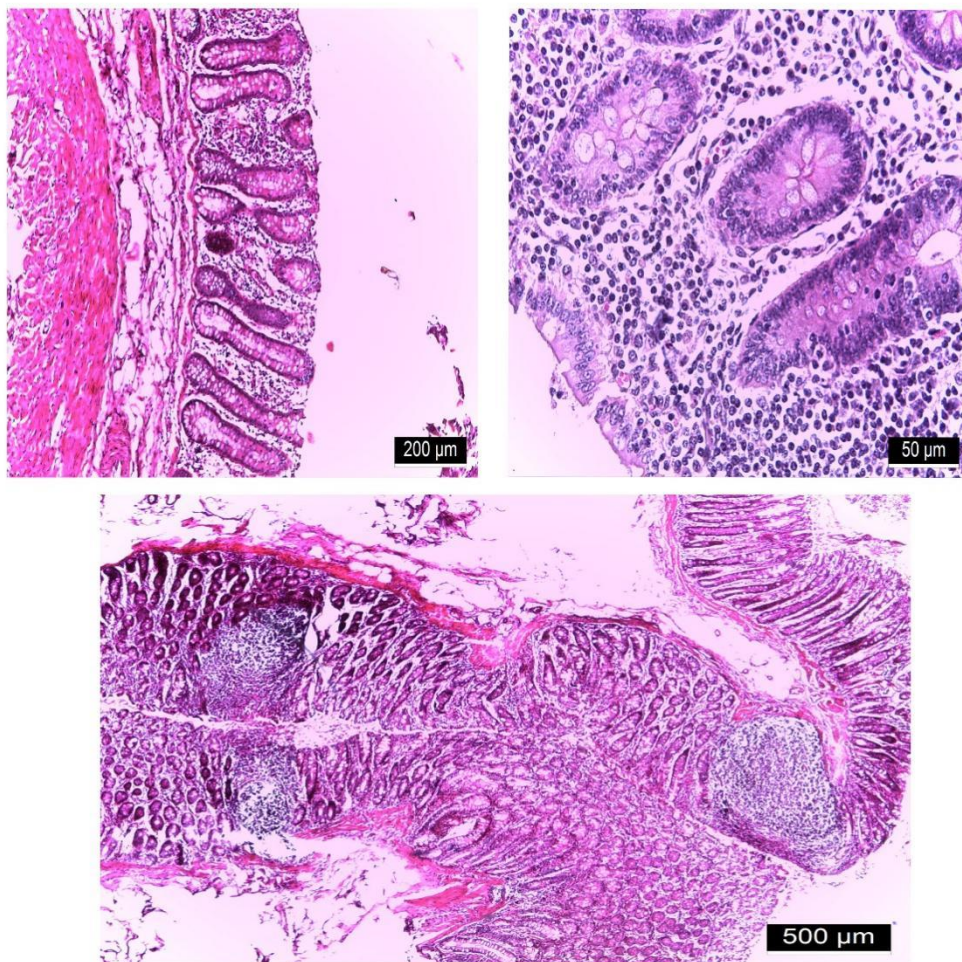


Figura 7.22. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1 (A) Structura histologică a cecumului: mucoasă, submucoasă. Musculoasă și seroasă. (B) Glandele Lieberkühn sunt alcătuite din celule caliciforme și enterocite. (B) Plăcile Peyer sunt localizate în submucoasă. Colorație HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)

Figure 7.22. Cecum of Pietrain pig. Experimental group 1 (A) Histologic structure of cecum: mucosal, submucosal. Muscous and serous. (B) Lieberkühn's glands consist of goblet cells and enterocytes. (B) Peyer's plaques are localized in the submucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)

LE2 prezintă o mucoasă reactivă, cu o infiltrație limfoepitelială în lamina propria și cu mai multe celule caliciforme în criptele intestinale. Plăcile Peyer sunt alcătuite din

limfonoduli mari ce pot depăși submucoasa și mucoasa, ajung până în lumenul intestinal (Figura 7.23.).

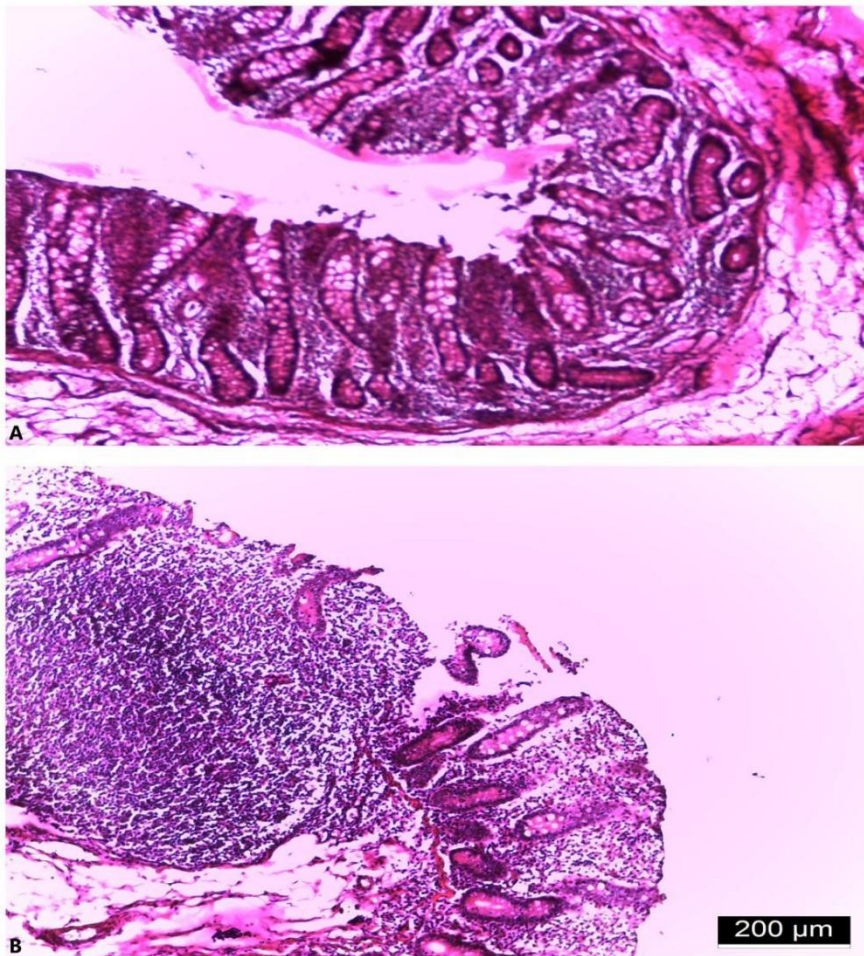


Figura 7.23. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2 (A) Glandele Lieberkühn sunt populate în special cu celule caliciforme. (B) Plăcile Peyer sunt mari și ajung până în lumenul intestinal. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.23. Pietrain pig Cecum. Experimental group 2 (A) Lieberkühn's glands are mainly populated with goblet cells. (B) Peyer's patches are large and reach into the intestinal lumen. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

LE3 are cea mai bună morfostructură dintre loturile experimentale. Glandele intestinale sunt lungi și înconjurată de numeroase limfocite și plasmocite alcătuind un infiltrat limfoid difuz în mucoasă. În submucoasă sunt activați numeroși noduli limfoizi alcătuind plăcile Peyer. Acestea acționează ca o barieră de apărare a imunității intestinale (Figura 7.24.).

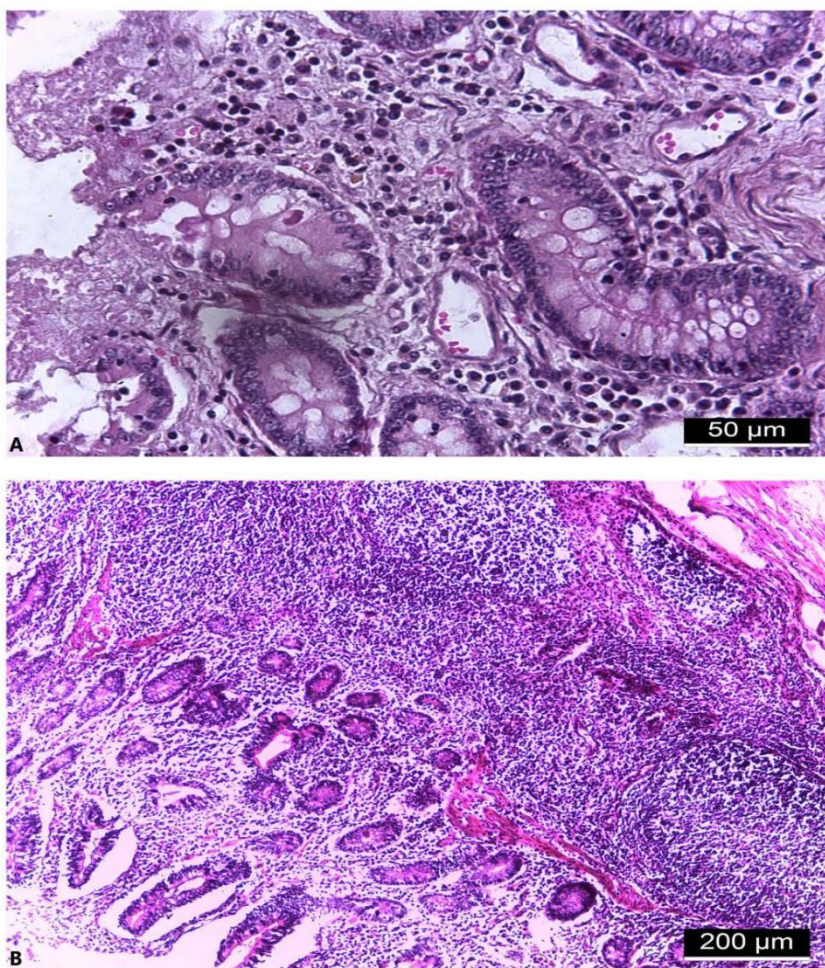


Figura 7.24. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3 (A) Glandele Lieberkühn sunt populate în special cu celule caliciforme, fiind înconjurate de un infiltrat limfoid. (B) Plăcile Peyer sunt mari și ajung până în lumenul intestinal. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.24. Cecum of Pietrain pig. Experimental group 3 (A) Lieberkühn's glands are mainly populated with goblet cells and surrounded by a lymphoid infiltrate. (B) Peyer's plaques are large and reach into the intestinal lumen. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

LE4 care a fost hrănit cu cea mai mare doză de tescovină prezintă glande intestinale mai joase decât cele de la LE3. De asemenea, au fost analizați mai puțini limfonoduli în submucoasă (Figura 7.25.).

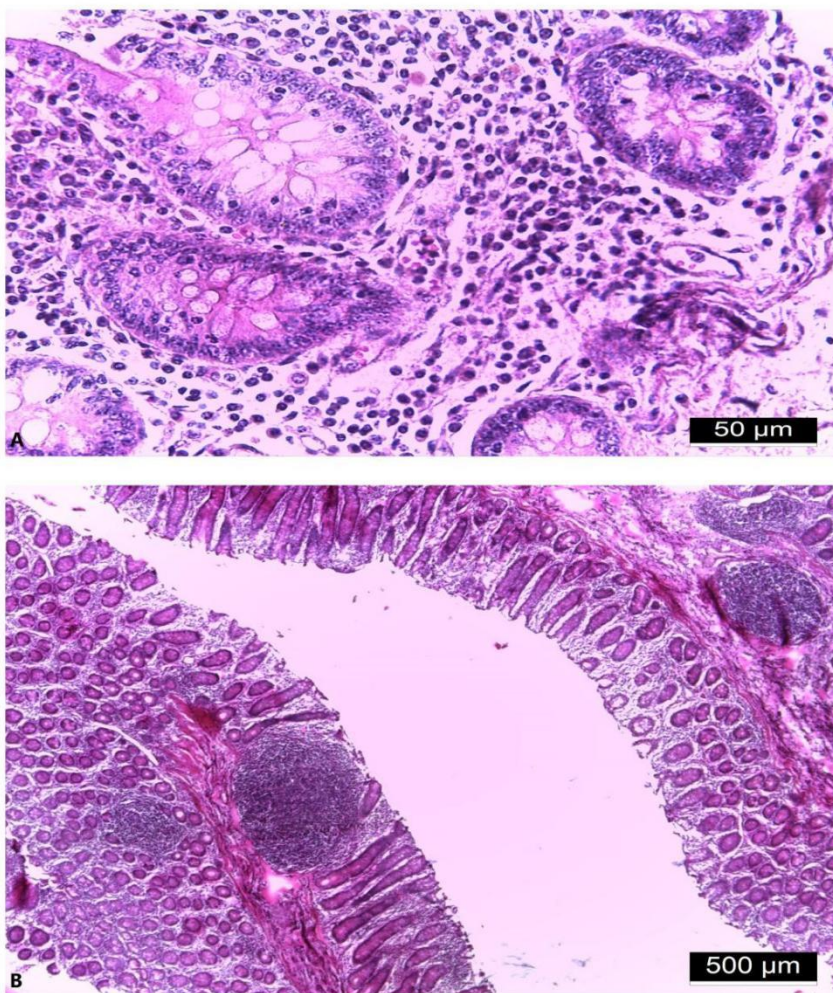


Figura 7.25. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4 (A) Glandele Lieberkühn sunt populate în special cu celule caliciforme. (B) Sunt observați limfonoduli atât în mucoasă cât și submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

Figure 7.25. Cecum of Pietrain pig. Experimental group 4 (A) Lieberkühn's glands are mainly populated with goblet cells. (B) Lymph nodes are observed in both mucosa and submucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)

7. 3. Discuții

În acest studiu, includerea polifenolilor în dietă, a determinat o creștere a numărului de leucocite în lamina propria și intraepitelial, indicând o migrație masivă de leucocite la grupurile experimentale. În timpul inflamației intestinale, leukocitele sunt recrutate la locul infecției sau inflamației unde, printr-o interacțiune complexă, contribuie la atragerea altor

celule imune și facilitează vindecarea mucoaselor prin eliberarea de mediatori chimici necesari răspunsului inflamator. Cu toate acestea, reactivitatea este benefică în cazul experimentului de față, deși recrutarea excesivă și acumularea de leucocite în intestin aparută în condiții patologice poate fi dăunătoare (Fournier și Parkos, 2012). S-a acceptat în mod obișnuit că leucocitele contribuie direct la patologia bolii atunci când sunt excesiv recrutate și activate conducând la eliberarea de substanțe toxice, migrație transepitelială masivă, modificări morfologice ale vilozităților și criptelor și leziuni extinse ale mucoasei (Fournier și Parkos, 2012). Este evident că leucocitele pot acționa ca o sabie cu două tăișuri care contribuie la homeostazie prin eliminarea agenților patogeni și participă la procese inflamatorii dăunătoare, procesează și agravează inflamația prin eliberarea mediatorilor pro-inflamatori. Astfel, prezența a numeroase leucocite din lamina propria sugerează că este posibil ca polifenolii din pulberea de struguri, ca și cei din mășline (Varricchio și col., 2019), să nu promoveze inflamația la porcii adulți. Rezultatele noastre sunt în acord cu cercetările anterioare în linia de celule monocite / macrofage murine J774, unde au fost utilizate diferite doze de hidroxiprosol capabil să prevină activarea macrofagelor (Maiuri et al., 2005) (Maiuri și colab.2005). Polifenolii exercită un efect modulator asupra răspunsului inflamator și în culturile de leucocite (Burzynska-Pedziwiatr și col., 2014; Derocette și col., 2013). De fapt, sunt capabili să deregleze răspunsul inflamator, păstrând țesuturile fără radicali liberi și împiedică astfel cascada inflamatorie (Denev și col., 2014).

În jejunul porcilor, plăcile Peyer sunt organizate sub formă de foliculi limfoizi asociați, în timp ce ileonul conține un folicul limfoid continuu (placă limfatică) care se extinde de la ileonul distal la colonul proximal (Binns și Licence, 1985). Semnificația funcțională a unei astfel de organizări limfoide nu este cunoscută, dar se poate specula că joacă rol de barieră imună a intestinului subțire (jejun și ileon), în care numărul de bacterii este moderat și a intestinului gros unde există microfloră abundentă, care conține și microorganisme potențial patogene.

Contactul cu microorganismele invadante este crucial pentru dezvoltarea și maturarea sistemului imunitar asociat intestinului (Žubčić și col., 2014). Acest sistem se dezvoltă treptat în primele 6 săptămâni de viață din mai multe etape dependente de alimentație și condițiile de mediu (Haverson și col., 2000; Lewis și col., 2012; Rothkötter și col., 1999). La nou-născuți, mucoasa intestinală este foarte subțire cu rare celule limfoide care prezintă antigen pentru celulele T care declanșează o reacție imunitară adecvată la adulți (Haverson și col., 2000).

Intestinul lor subțire conține placi Peyer rudimentare (PP), care se extind nespecific prin proliferarea rapidă intrafolliculară a limfocitelor B la două săptămâni postpartum (Pabst și col., 1988). Simultan cu creșterea numerică a limfocitelor B, numărul limfocitelor T din interiorul laminei propria și a zonelor interfoliculare este redus (Rothkötter și Pabst, 1989). Apariția treptată a unor limfocite T convenționale, activate, este influențată de un influx de antigeni care sunt prezentați de celule dendritice, împreună cu complexul major de histocompatibilitate clasa II (MHC II +) și markeri de membrană CD45 și CD16 cu care realizează o coexpresie (Haverson și col., 2000). Între a doua și a patra săptămână de viață, are loc o creștere a numărului de limfocite CD4+ mature în lamina propria, în timp ce limfocitele T CD8+ cresc numeric semnificativ de la 4 la 6 săptămâni de viață (Haverson și col., 2000). În mod similar, au fost surprinse în număr semnificativ plasmocite IgA+ după a patra săptămână de viață (Pabst și Rothkötter, 1999; Žubčić și col., 2014), deși apariția limfocitelor B producătoare de IgA în lamina propria au fost semnalate în a șasea zi de viață (Pabst și Rothkötter, 1999). Imunoblastele IgM+ apar mai devreme și depășesc numărul de imunoblastele IgA+ după 3 săptămâni (Brown și col., 2006). Maturarea imunității la porcii înțărcați ca urmare a interacțiunii cu antigene de mediu și atingerea imunocompetenței asemanatoare adulților se instalează de la 7 până la 9 săptămâni de viață, determinată fie de distribuția celulelor imune în intestinul subțire (Vega-Lopez și col., 1993) sau prin analize funcționale in vitro (Brown și col., 2006) și prin definirea rolului laminei propria ca loc efector al mucoasei pentru vaccinurile administrate per os (Stokes și Bailey, 2000). Tipurile de limfocite variază în funcție de zonă și vârsta animalului. Astfel limfocitele CD4+ au fost rare în foliculi și moderat numeroase în zona interfoliculară. Limfocitele CD8+ au fost văzute sporadic în foliculii limfoizi, dar au fost numeroase în zona interfoliculară. Limfocitele B CD21+ au fost foarte numeroase în foliculi. Nu au fost observate diferențe legate de vârstă între grupurile experimentale de la 3 zile la 4 luni (Wasowicz și col., 2018).

Până în prezent există suficiente dovezi pentru a sprijini efectul antiinflamator și o activitate de stimulare imunitară a polifenolilor (Guo și col., 2009; Hur și col., 2012; Joseph și col., 2016). Expresia COX-2 (un marker al inflamației) în grupul experimental care a primit polifenoli în dietă este redusă în intestinul subțire și mai evidentă în colon. Capacitatea polifenolilor de a acționa sub formă de antioxidanți sau de epurare a radicalilor liberi, precum și capacitatea lor de a inhiba unele enzime implicate în generarea de radicali liberi, cum ar citocrom-oxidază P450, lipoxigenaze, COX, se datorează grupărilor hidroxilice care sunt

bune donatoare de hidrogen (Pereira și col., 2009). Polifenolii își exercită proprietățile antiinflamatorii multiple prin modularea proteinei kinază de activare a mitogenului și a factorul nuclear -j. O altă cale este cea de inhibare a citokinelor inflamatorii și a chemokinelor, suprimarea activității citokinei oxid-sintetază inductibilă și COX (Hou și col., 2007; Luceri și col., 2002; Plummer și col., 1999). COX-2 este o enzimă inductibilă care transformă acidul arahidonic în prostaglandine și în general este indus la locul inflamației ca răspuns la stimulii inflamatori incluzând citokine pro-inflamatorii cum ar fi interleukina-1 $\alpha\beta/b$, interferon-c și factorul de necroză tumorală produs de celulele inflamatorii și promotori tumoralii cum ar fi acetatul de tetradecanoil phorbol și Ras (Wang și DuBois, 2010). În studiul lui Varricchio și col., (2019), imunoreactivitate COX-2 a fost detectată în leucocitele infiltrate în mucoasa, în plăcile Peyer și în foliculii solitari din cecum și colon la porcii hrăniți cu dietă bazată pe polifenoli din măslin. La porcii hrăniți cu dietă îmbogățită cu polifenoli, imunoreactivitatea COX-2 era destul de slabă. Nivelul scăzut de expresie COX-2 în celulele imunoreactive din intestin la porcii tratați cu polifenoli ar putea sugera un rol protector al polifenolilor, modulând și reducând răspunsul inflamator. Acest lucru este în acord cu Willenberg și col., (2015), care a raportat reducerea indusă de polifenoli a expresiei COX-2 atât in vitro (linia de celule canceroase HCA-7 și monocite primare) și in vivo (șoareci C57BL / 6N). In vivo efectul polifenolilor asupra morfologiei vilozităților intestinale este controversat. Fiesel și col., (2014), raportează absența modificării înălțimii vilozitatilor și a adâncimii criptelor în intestinul subțire a porcilor înțărcați și hrăniți semințe de struguri și extract de făină de tescovină, în timp ce (Sehm și col., 2006) raportează că la purcei, tescovina de struguri roșii au avut un efect inhibitor asupra creșterii înălțimii vilozităților jejunale.

Asemănător rezultatelor obținute în acest experiment au fost raportate și de alți cercetători precum Gessner și col., (2013) care au administrat 10 g tescovină la purcei de 6 săptămâni, îmbunătățind morfostructura intestinală prin creșterea raportului înălțime vilozități și adâncime cripte intestinale. Wang și col., (2020) au raportat că înălțimea vilozităților a crescut în urma introducerii în hrana purceilor de 28 de zile a 50 g de tescovină. Morfostructura intestinală a fost promovată și de administrarea de 250g/kg a extractului de proantocianine la purcei aflați în perioada de înțarcare (Han și col., 2016). În schimb, Fiesel și col., (2014) și Taranu și col., (2018) au raportat că polifenolii ce aparțin subproduselor de sturguri nu au avut niciun efect asupra morfostructurii intestinale nici la purcei de 5 săptămâni și respectiv porci aflați în perioada de creștere-finisare.

7. 4. Concluzii parțiale

Polifenolii din tescovina de struguri negri a determinat apariția de infiltrații limfoide difuze la nivelul laminei propria a mucoasei duodenale, aglomerarea limfonodulilor în submucoasa jejunului, ileonului și a cecum, comparativ cu lotul martor (LM).

A existat, de asemenea, o creșterea a înălțimii vilozităților intestinale și a adâncimii criptelor intestinale în cazul loturilor experimentale, demonstrând faptul că polifenolii din tescovina de struguri negri promovează morfostructura intestinală.

Cele mai bune rezultate pentru porci din rasa Pietrain de 180 de zile, atât în intestinul subțire cât și în cecum, s-au obținut la doza de 10g/kg oferită LE3.

8. EXPRESIA IMUNOHISTOCHIMICĂ A MARKERILOR PRO-INFLAMATORII (IL-1 β , TNF- α ȘI MCH-II) ȘI REDOX (NRF2 ȘI P65) LA NIVELUL INTESTINULUI PENTRU PORCII HRĂNIȚI CU TESCOVINĂ DE STRUGURI NEGRI

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY (IL-1 β , TNF- α AND MCH-II) AND REDOX (NRF2 AND P65) MARKERS IN THE INTESTINES OF BLACK STRIP TESCOVIN-ROASTED SWINE

Din punct de vedere funcțional, mecanismele imunitare intestinale joacă un rol complex în prevenirea și controlul infecțiilor intestinale, tolerând în același timp numeroși antigeni alimentari și antigeni nepericuloși din flora intestinală. Obiectivul acestui capitol este de a analiza din punct de vedere imunohistochimic reactivitatea sistemului imunitar intestinal în urma introducerii în hrană a tescovinei din struguri negri. Este urmărită evoluția intensității IHC a markerilor pro-inflamatori (IL-1 β , TNF- α și MCH-II) și markerilor redox (Nrf2 și p65) la doze crescânde de tescovină: 1g, 5g, 10g și 15g în 100 kg furaj.

8. 1. Material și metodă

Cercetarea s-a desfășurat în cadrul Laboratorului de Histologie și Embriologie a Facultății de Medicină Veterinară Iași, în continuarea experimentului din capitolul anterior. După obținerea preparatelor histologice până la etapa de etalare, au fost selectate câte 5 lame pentru fiecare lot în parte (LM, LE1, LM2, LM3, LM4) ajungând la un total de 25 de lame analizate pentru acest experiment.

Colorarea imunohistochimică (IHC) a fost efectuată utilizând o serie de anticorpi specifici ca markeri. Patru regiuni cheie au fost analizate (duoden, jejun, ileon și colon) cu markeri specifici inflamației IL-1 β (Cat No.6806-1-AP, Proteintech, Proteintech Group, Inc, 5500 Pearl Street, Suite 400, Rosemont, IL 60018, USA), TNF- α (Catalog: AF690, Bio-Techne, R&D Systems, Inc.614McKinleyPlaceNEMinneapolis,MN55413), CMH-II (HLA-DQ1/DQ3 Monoclonal Antibody (HL-37 Cat MA1-19143, Thermo Fisher Scientific Inc. 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451), p65 (NF-kB p65 Polyclonal Antibody, Invitrogen, Cat PA5-16545, Thermo Fisher Scientific Inc. 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451)

și cu rol de evidențierea a efectului antioxidant Nrf2 (Catalog No. ABIN676673, antibodies-online.com, Jones Boulevard 32119464, Limerick PA, United States).

Preparatele au fost inițial deparafinate în 3 băi de xilen, hidratate în alcool etilic și apoi introduse la microunde la 95°C timp de 10 min într-un tampon de citrat, pH 6,0, 10x, Antigen Retriever (C9999, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SUA). După aceea, preparatele au fost lăsate să se răcească timp de 20 de minute la temperatura camerei și apoi clătite de 3 ori în PBS (P4417, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SUA) timp de 5 minute fiecare. Apoi, au fost incubate peste noapte la 4°C într-o cameră umedă cu anticorpi primari. Anticorpul primar a fost diluat într-un raport de: 1:100 IL-1 β , Nrf2, p65 și CMH-II; și un raport de 1:200 TNF- α . A doua zi, preparatele au fost spălate de trei ori cu PBS timp de 5 minute pentru fiecare baie și apoi au fost incubate cu anticorpi secundari (Goat Anti-Rabbit HRP, ab205718, Abcam, Cambridge, Marea Britanie) diluați în același raport cu anticorpii primari. Secțiunile au fost puse în contact cu Substrat de 3,30-diaminobenzidină (DAB, ab64238, Abcam, Cambridge, Marea Britanie) și ulterior contra-colorate cu hema-toxylin (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Ulterior, au fost examinate și fotografiate cu ajutorul unui microscop optic (Leica DM750, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germania).

Cantitatea de celule colorate pozitiv și relațiile lor au fost exprimate printr-un sistem simplu de notare calitativă așa cum au făcut Zimmermann și colaboratorii (Zimmermann și col., 2014). În acest caz, lamelor investigate li s-a atribuit punctajul "+++" (colorare IHC puternică) "++" (colorare IHC moderată), "+" (colorare IHC slabă) și "-" (nicio colorare vizibilă).

8.2. Rezultate

Expresia IHC a markerilor pro-inflamatori (IL-1 β , TNF- α și MHC-II) la nivelul duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la porcii hrăniți cu polifenoli din pudră de tescovină de struguri negri.

Pentru a evalua potențialul anti-inflamator al polifenolilor din strugurii negri, sunt analizați simultan, din punct de vedere IHC, următorii trei markeri: IL-1 β , TNF- α și MHC-II. Rezultatele obținute indică faptul că toți markerii analizați au variat în funcție de doza de tescovină adăugată în furaj (Tabel 8.1.).

Tabel 8.1.

Expresia IHC a markerilor Il-1 β , TNF- α și MHC-II la nivelul duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la porcii hrăniți cu pudră de tescovină de struguri negri

Table 8.1.

IHC expression of Il-1 β , TNF- α and MHC-II markers in the duodenum, jejunum, ileum and cecum of pigs fed black grape tescovin powder

Marker	Organ	LM	LE1	LE2	LE3	LE4
Il-1β	duoden	+++	+++	+++	++	++
	jejun	+++	+++	+++	++	+++
	ileon	+++	++	++	+	+
	cecum	+++	+++	++	+	++
TNF-α	duoden	+++	++	++	+	+
	jejun	+++	++	++	+	++
	ileon	+++	++	++	+	++
	cecum	+++	++	++	+	++
MHC-II	duoden	+++	++	++	+	+
	jejun	+++	+++	++	+	++
	ileon	+++	+++	++	++	++
	cecum	+++	+++	++	+	++
Rezultatele reprezintă observații calitative (scoruri vizuale): "+++" (colorare IHC puternică) "++" (colorare IHC moderată), "+" (colorare IHC slabă) și "-" (nicio colorare vizibilă)						

Expresia Il-1 β în duoden este cea mai puternică la LM, LE1 și LE2. Pentru LE3 și LE4 expresia este moderată (Figura 9.1.). În jejun, doar pentru LE3 expresia Il-1 β a fost moderată, iar pentru LM și restul loturilor experimentale colorarea IHC a fost de asemenea puternică (Figura 8.2.). Schimbări majore sunt observate pentru acest marker în cazul ileonului unde expresia IL-1 β a fost slabă pentru LE3 și LE4, iar pentru LE2 și LE1 expresia păstrându-se moderată iar pentru LM fiind puternică (Figura 8.3.). În cecum, cea mai slabă colorare este observată la LE3, crescând treptat spre moderat la LE2 și LE4, devenind puternică la LE1 și LM (Tabel 8.1), (Figura 8.4). Il-1 β este un marker pro-inflamator ce indică prezență unui proces inflamtor la LM și LE1. Dozele crescânde de polifenoli din pulberea de tescovină de struguri negri a redustreptat inflamația în următoarele loturi experimentale: LE2, LE4 și LE3. Cele mai bune rezultate au fost obținute când s-a adăugat în hrana porcilor 10g/kg pulbere de tescovină de struguri negri, obținându-se o expresie slabă a markerului IL-1 β , în special în ileon și cecum.

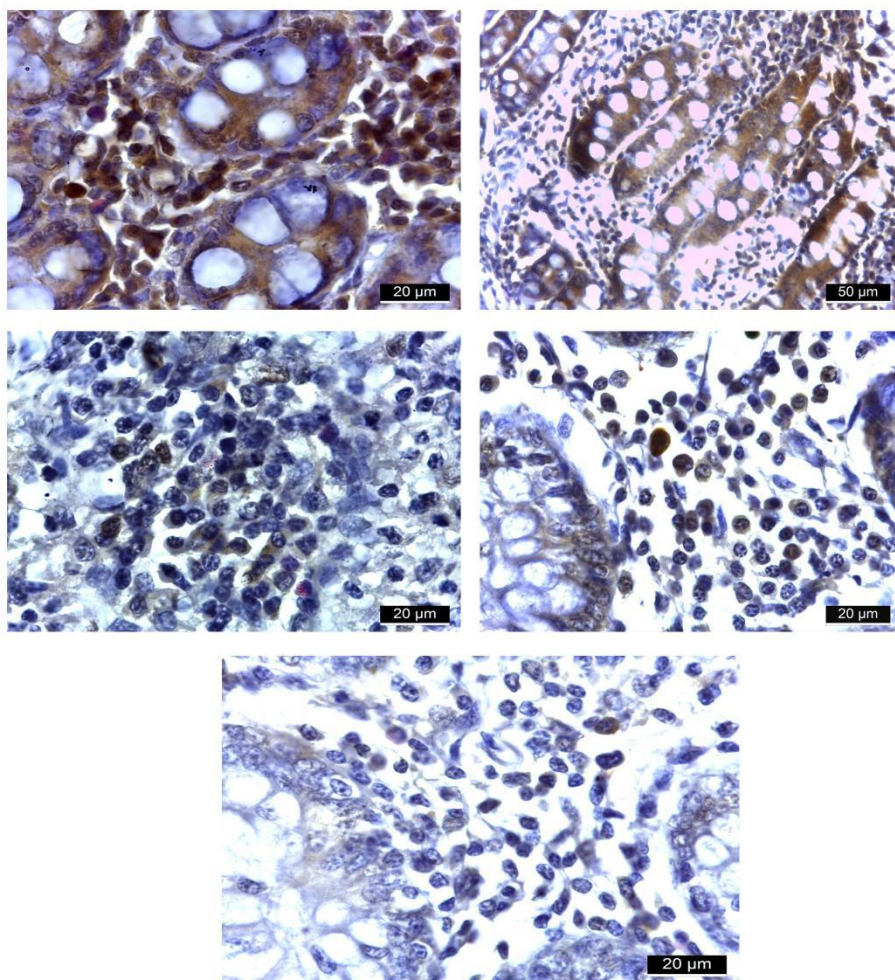


Figura 8.1. Expresia IHC a markerului Il-1 β în duoden. (A) Lotul martor, (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti Il-1 β x1000 (A, C, D, E), anti Il-1 β x400 (B)

Figure 8.1. IHC expression of the Il-1 β marker in the duodenum. (A) Control group, (B) Experimental 1 and (C) Experimental 2. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti Il-1 β x1000 (A, C, D, E), anti Il-1 β x400 (B)

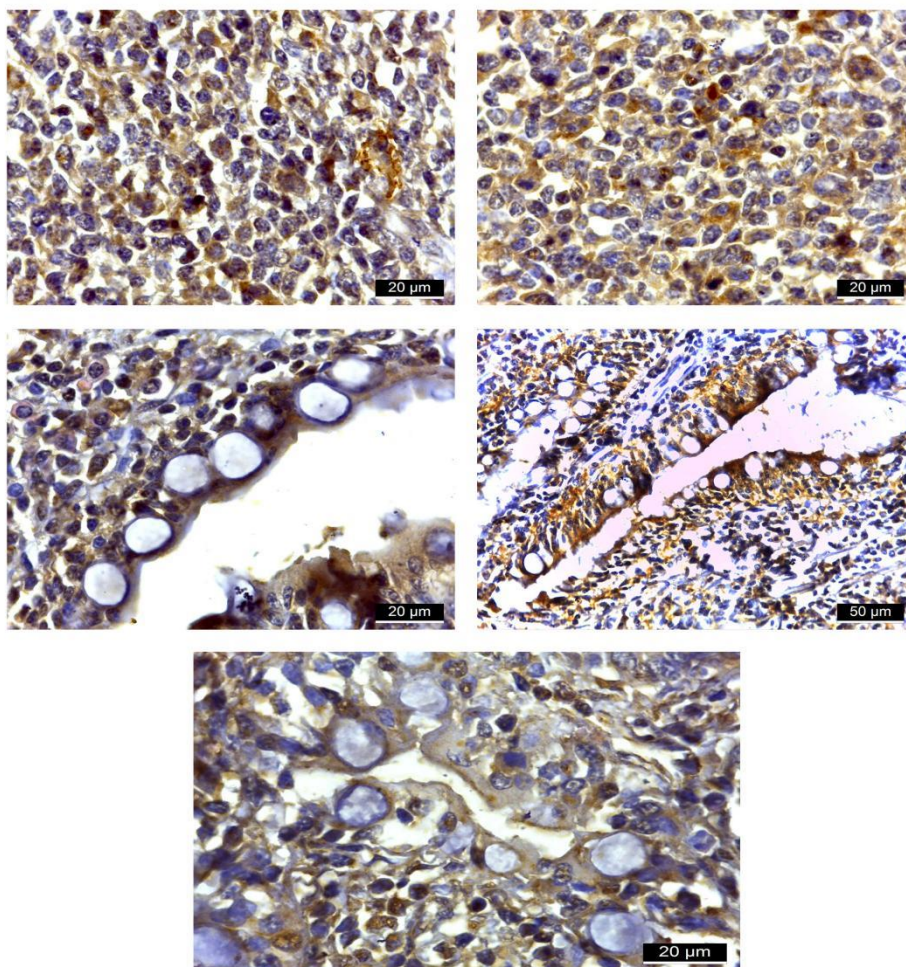


Figura 8.2. Expresia IHC a markerului $\text{IL-1}\beta$ în jejun. (A) Lotul martor, (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti $\text{IL-1}\beta \times 1000$ (A, C, D, E), anti $\text{IL-1}\beta \times 400$ (B)

Figure 8.2. IHC expression of the $\text{IL-1}\beta$ marker in the jejunum. (A) Control group, (B) Experimental 1, (C) Experimental 2 and (E) Experimental group 4. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti $\text{IL-1}\beta \times 1000$ (A, C, D, E), anti $\text{IL-1}\beta \times 400$ (B)

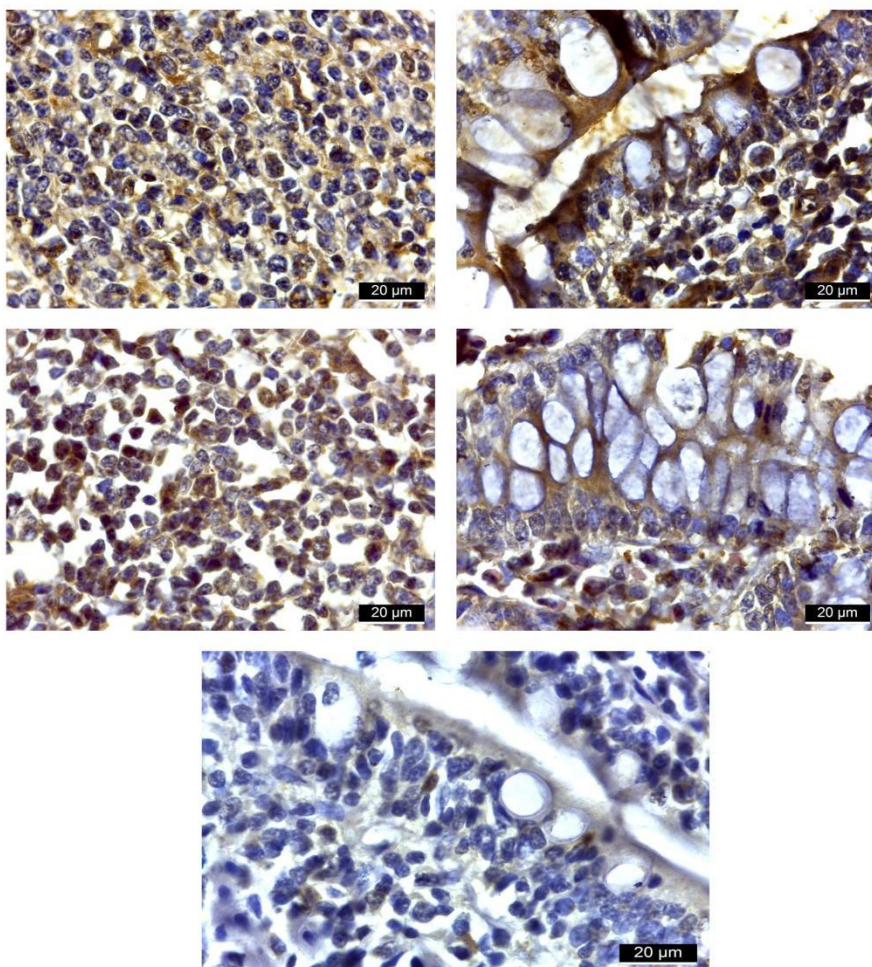


Figura 8.3. Expresia IHC a markerului $\text{IL-1}\beta$ în ileon. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti $\text{IL-1}\beta \times 1000$ (A, B, C, D, E)

Figure 8.3. IHC expression of the $\text{IL-1}\beta$ marker in the ileum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria. (B) Experimental batch 1 and (C) Experimental batch 2. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti $\text{IL-1}\beta \times 1000$ (A, B, C, D, E)

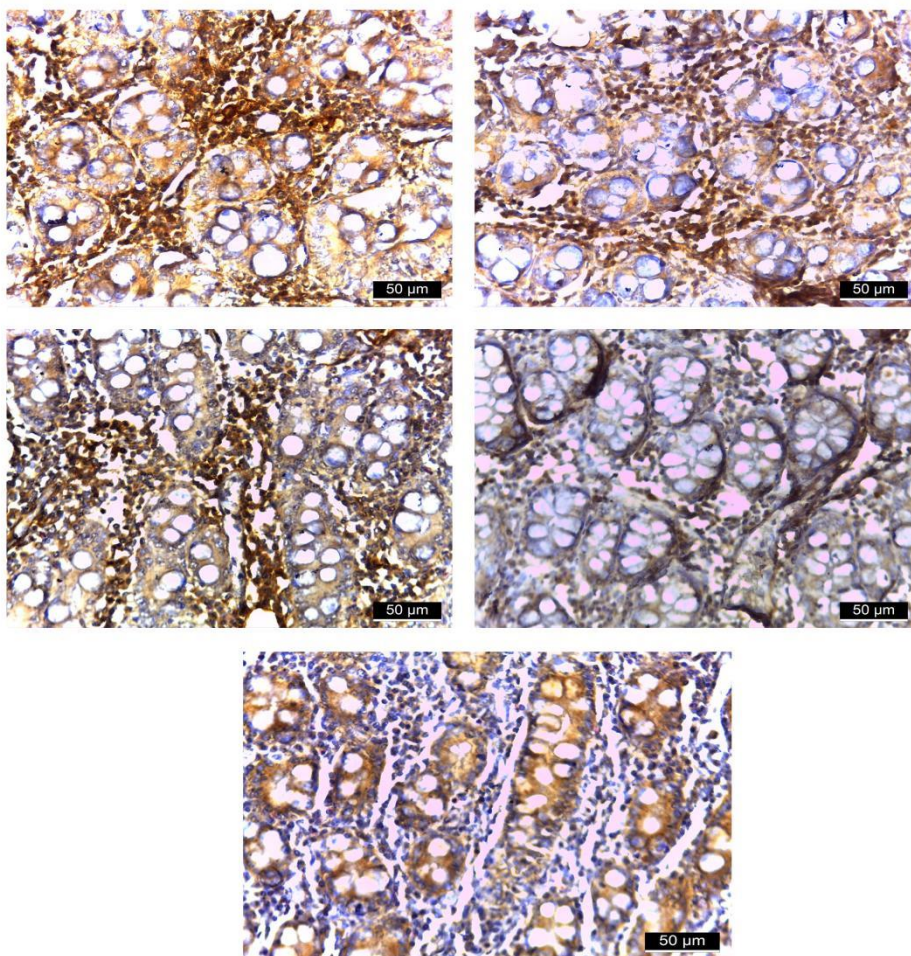


Figura 8.4. Expresia IHC a markerului $\text{IL-1}\beta$ în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în glandele intestinale și lamina propria. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în glandele intestinale și lamina propria. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele intestinale. Colorație IHC anti $\text{IL-1}\beta \times 400$ (A, B, C, D, E)

Figure 8.4. IHC expression of the $\text{IL-1}\beta$ marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1. Strong expression in intestinal glands and lamina propria. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in intestinal glands and lamina propria. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and intestinal glands. IHC staining anti $\text{IL-1}\beta \times 400$ (A, B, C, D, E)

În duoden, $\text{TNF-}\alpha$ a fost pozitiv în toate loturile experimentale. Cea mai puternică expresie este observată la LM, scăzând dreptat la celelalte loturi experimentale. Pentru LE1 și LE2 colorarea IHC a markerului $\text{TNF-}\alpha$ este moderată, iar pentru LE3 și LE4 este slabă (Figura 8.5.). În jejun, ileon și cecum, de asemenea, cea mai puternică expresie a lui $\text{TNF-}\alpha$ este pentru LM. LE1, LE2 și LE4 au o colorare moderată, pe când cea mai slabă colorare este înregistrată la LE3 (Figura 8.6.), (Figura 8.7.), (Figura 8.8.). Prin expresia IHC a markerului

TNF- α în mucoasa intestinală, indică prezența unui proces inflamator. La LM expresia a fost cea mai puternică. Introducându-se în hrana porcilor dozele crescânde 1, 5 și 15 g/kg pulbere de tescovină de struguri negri, expresia TNF- α a fost moderată, indicând o scădere a inflamației la aceste loturi. Cel mai bun rezultat a fost obținut cu doza de 10g/kg pulbere de tescovină de struguri negri care a reglat în jos expresia markerului pro-inflamator TNF- α , în toate segmentele intestinale analizate.

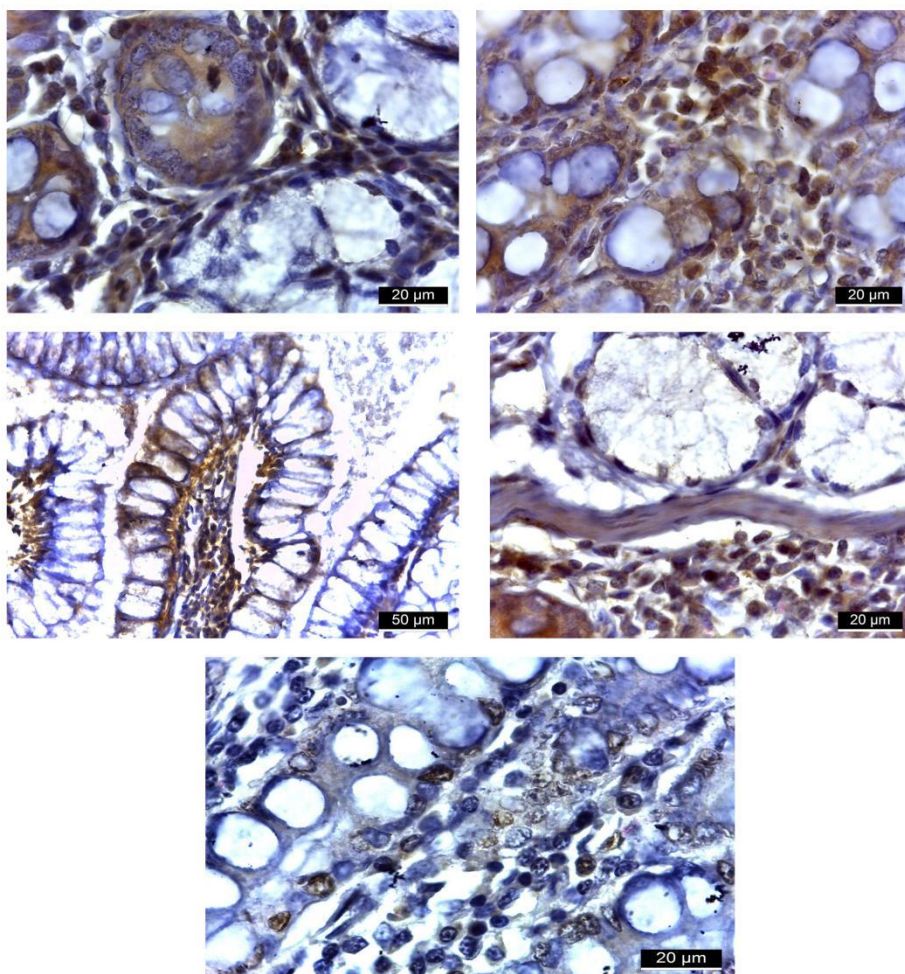


Figura 8.5. Expresia IHC a markerului TNF- α în duodenum. (A) Lotul martor. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și Brunner și în spațiul periglandular. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2.

Expresie moderată în lamina propria și în epiteliul columnar. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria, glandele Lieberkühn, glandele Brunner și muscularis mucosae. Colorație IHC antiTNF- α 1000 (A, B, D, E), anti TNF- α 400 (C)

Figure 8.5. IHC expression of the TNF- α marker in the duodenum. (A) Control group. Strong expression in the Lieberkühn's and Brunner's glands and periglandular space. (B) Experimental batch 1 and (C) Experimental batch 2. Moderate expression in lamina propria and columnar epithelium. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria, Lieberkühn's glands, Brunner's glands and muscularis mucosae. IHC staining anti TNF- α 1000 (A, B, D, E), anti TNF- α 400 (C)

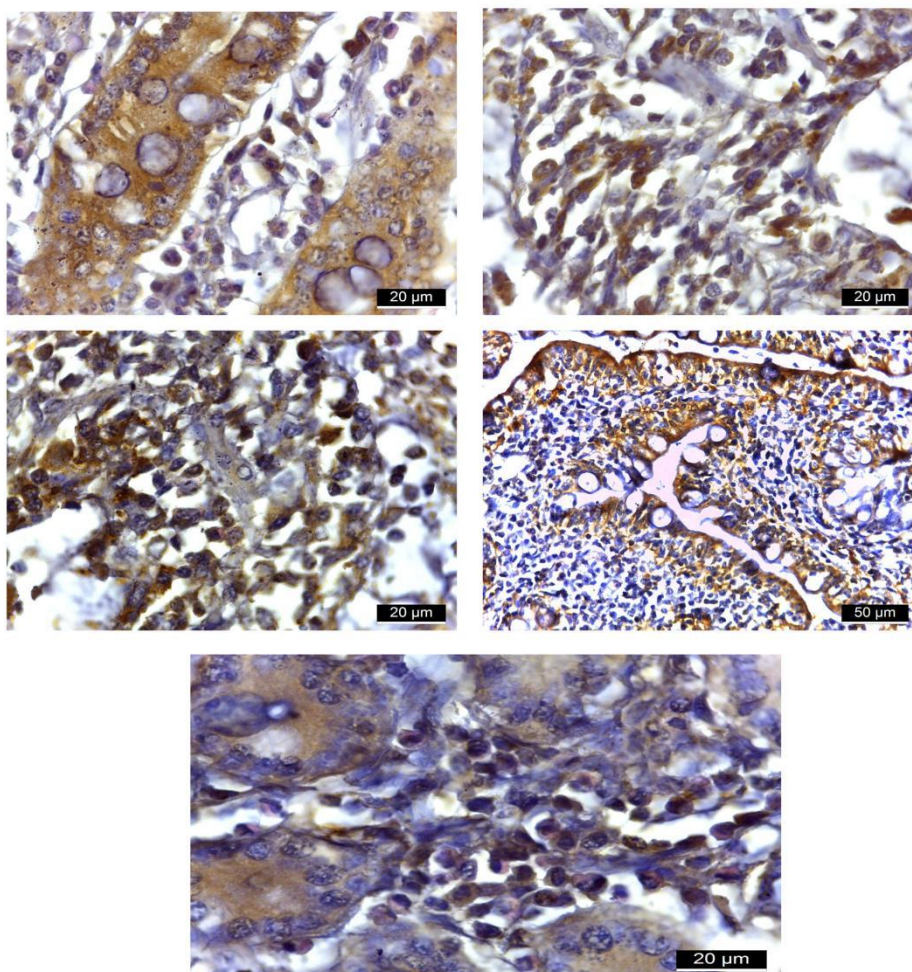


Figura 8.6. Expresia IHC a markerului TNF- α în jejun. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în epiteliul columnar. Colorație IHC anti TNF- α x1000 (A, B, C, E), anti TNF- α x400 (D)

Figure 8.6. IHC expression of TNF- α marker in the jejunum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and columnar epithelium. IHC staining anti TNF- α x1000 (A, B, C, E), anti TNF- α x400 (D)

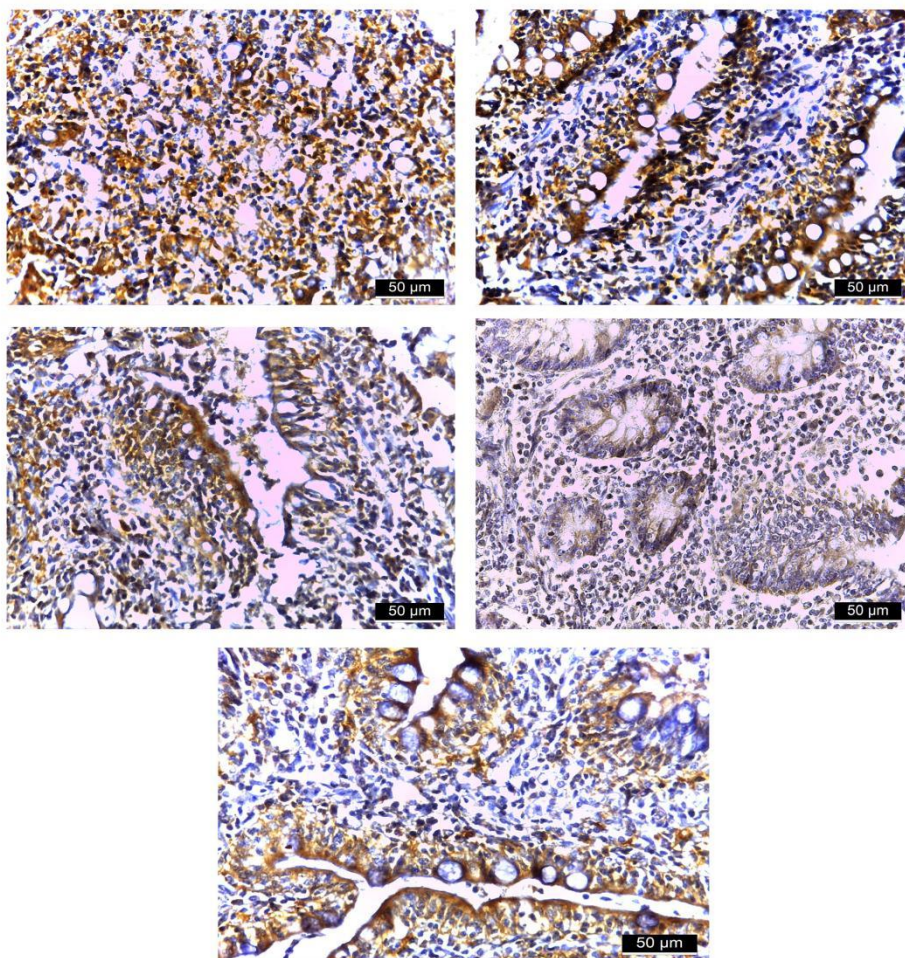


Figura 8.7. Expresia IHC a markerului TNF- α în ileon. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în epiteliul columnar. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn.. Colorație IHC anti TNF- α x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.7. IHC expression of TNF- α marker in the ileum. (A) Control group. Strong expression in the lamina propria. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and columnar epithelium. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti TNF- α x100 (A, B, C, D, E)

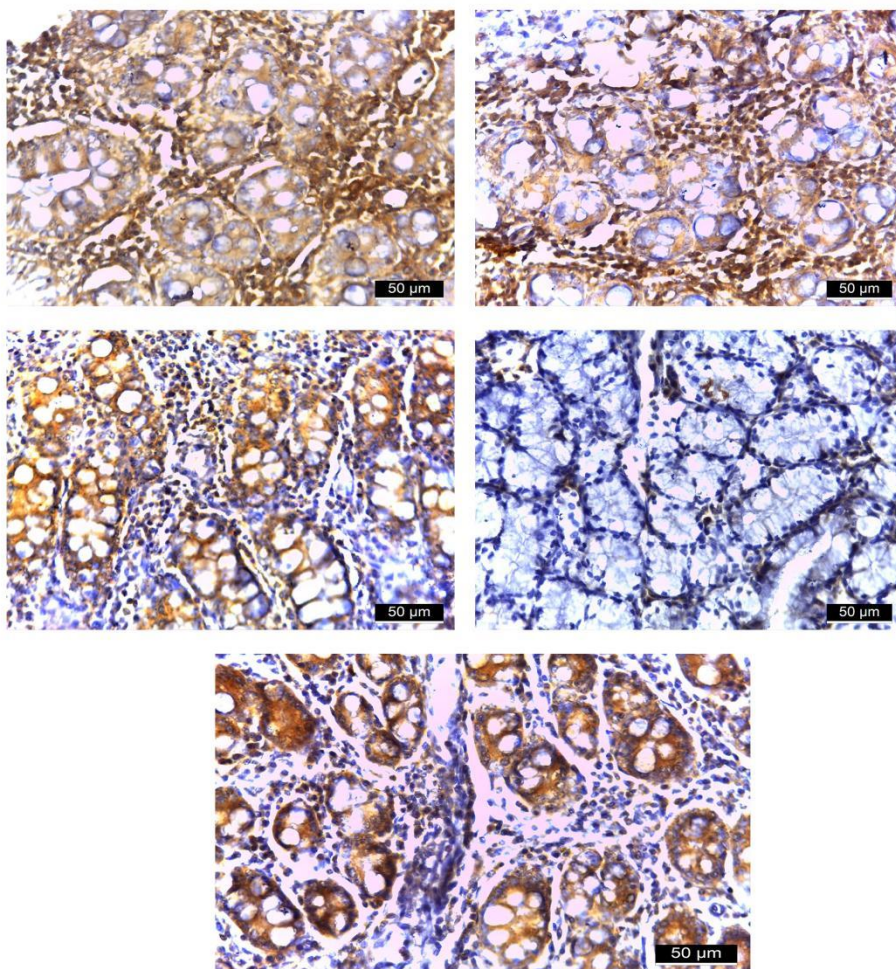


Figura 8.8. Expresia IHC a markerului TNF- α în cecum. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn.. Colorație IHC anti TNF- α 100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.8. IHC expression of TNF- α marker in cecum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC anti TNF- α 100 staining (A, B, C, D, E)

Markerul MHC-II a fost studiat prin IHC în duoden, jejun, ileon și cecum la toate loturile experimentale. În duoden, expresia IHC a markerului MHC-II este cea mai puternică la LM, moderată la LE1 și LE2 și slabă la LE3 și LE4 (Figura 8.9.). În jejun, atât LM cât și LE1 au o colorare puternică a lui MHC-II, intensitatea scăzând treptat la moderat pentru LE2 și LE4, până la o expresie scăzută la LE3 (Figura 8.10.). În ileon, expresia markerului MHC-II pentru LM și LE1 sunt la fel ca la jejun, diferită fiind colorarea IHC la LE3 fiind una

moderată, la fel ca la LE2 și LE4 (Figura 8.11.). În cecum, expresia MHC-II este puternică la LM și LE1, moderată la LE2 și LE4 și slabă la LE3 (Figura 8.12.). Per total, cele mai bune rezultate au fost obținute cu doza de 10g/kg de pulbere de tescovină de struguri negri (LE3) care au reglat în jos expresia markerului MHC-II.

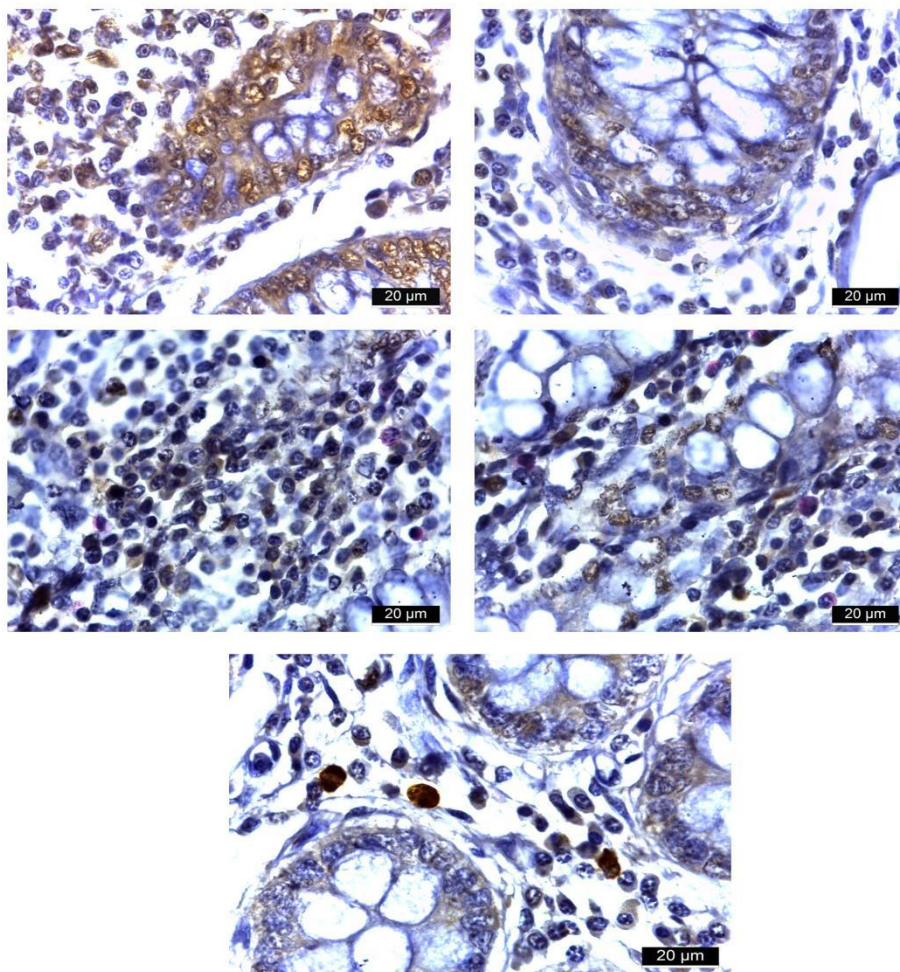


Figura 8.9. Expresia IHC a markerului MHC-II în duoden. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti MHC-IIx400 (A, B, C, D, E)

Figure 8.9. IHC expression of the MHC-II marker in the duodenum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC anti MHC-IIx400 staining (A, B, C, D, E)

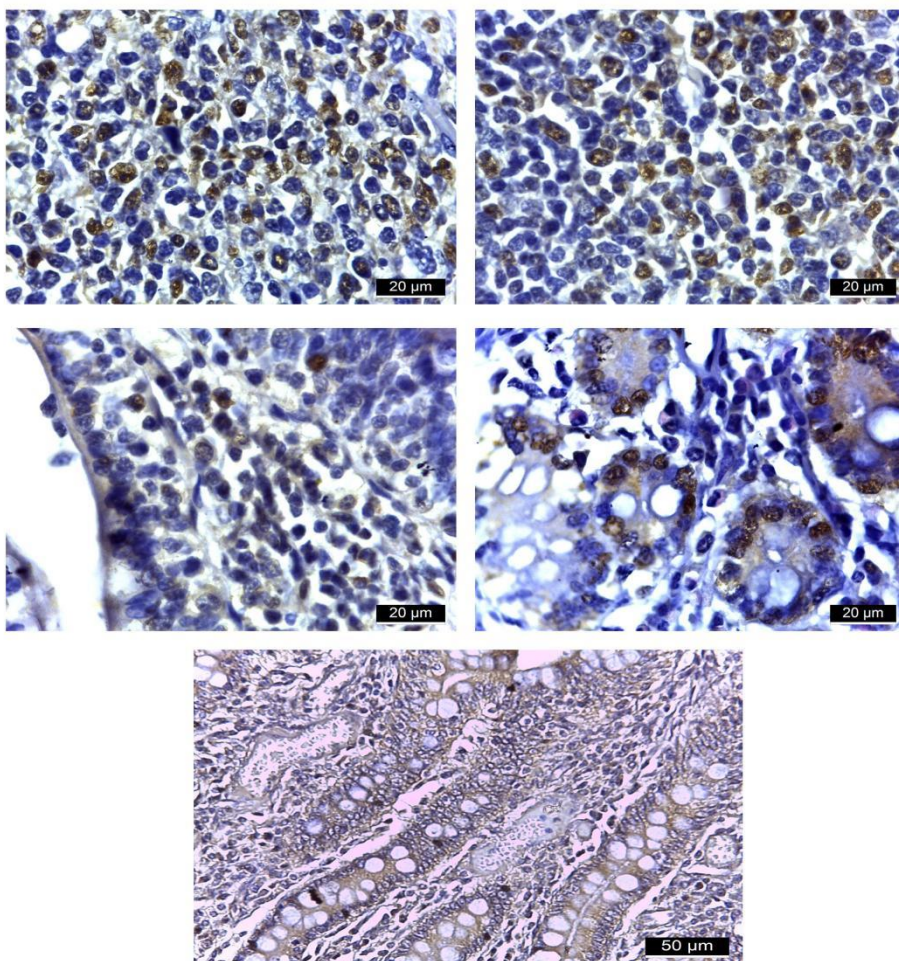


Figura 8.10. Expresia IHC a markerului MHC-II în jejun. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în lamina propria. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria, epiteliul columnar și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti MHC-IIx400 (A, B, C, D), anti MHC-IIx100 (E)

Figure 8.10. IHC expression of MHC-II marker in jejunum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Strong expression in the lamina propria. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria, columnar epithelium and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti MHC-IIx400 (A, B, C, D), anti MHC-IIx100 (E)

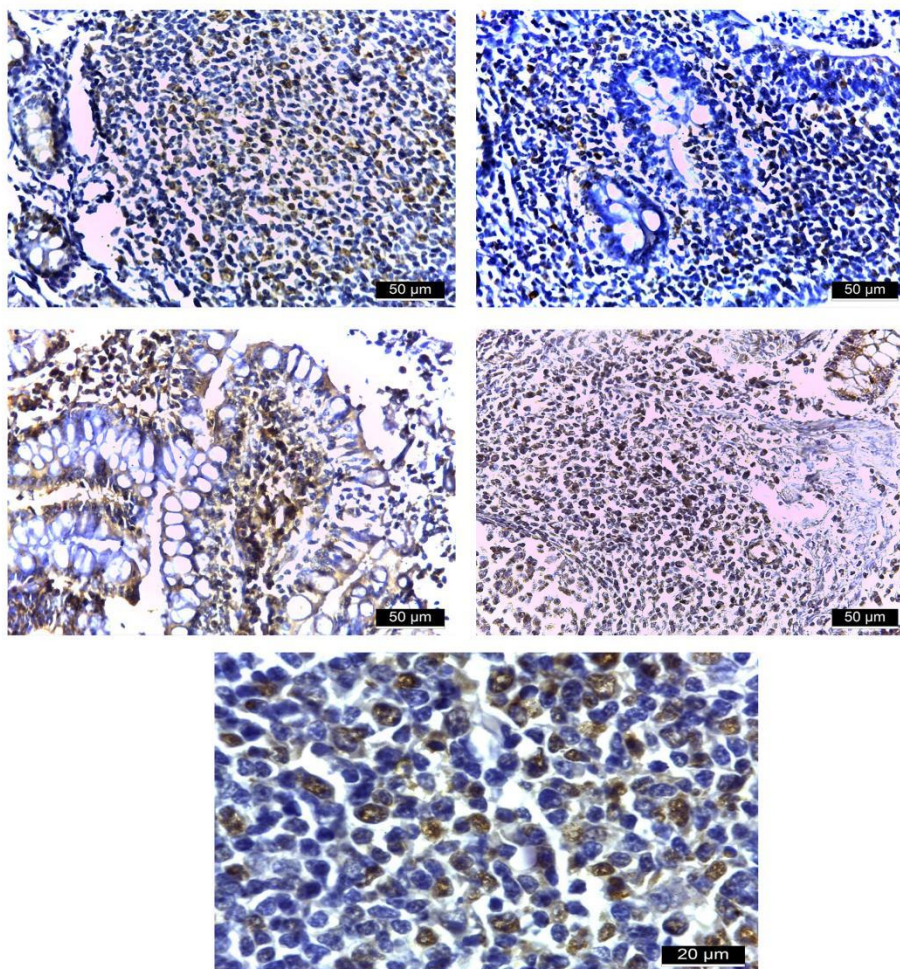


Figura 8.11. Expresia IHC a markerului MHC-II în ileon. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în lamina propria. (C) Lotul experimental 2, (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti MHC-IIx100 (A, B, C, D), anti MHC-IIx400 (E)

Figure 8.11. IHC expression of the MHC2 marker in the ileum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Strong expression in the lamina propria. (C) Experimental group 2, (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti MHC-IIx100 (A, B, C, D), anti MHC-IIx400 (E)

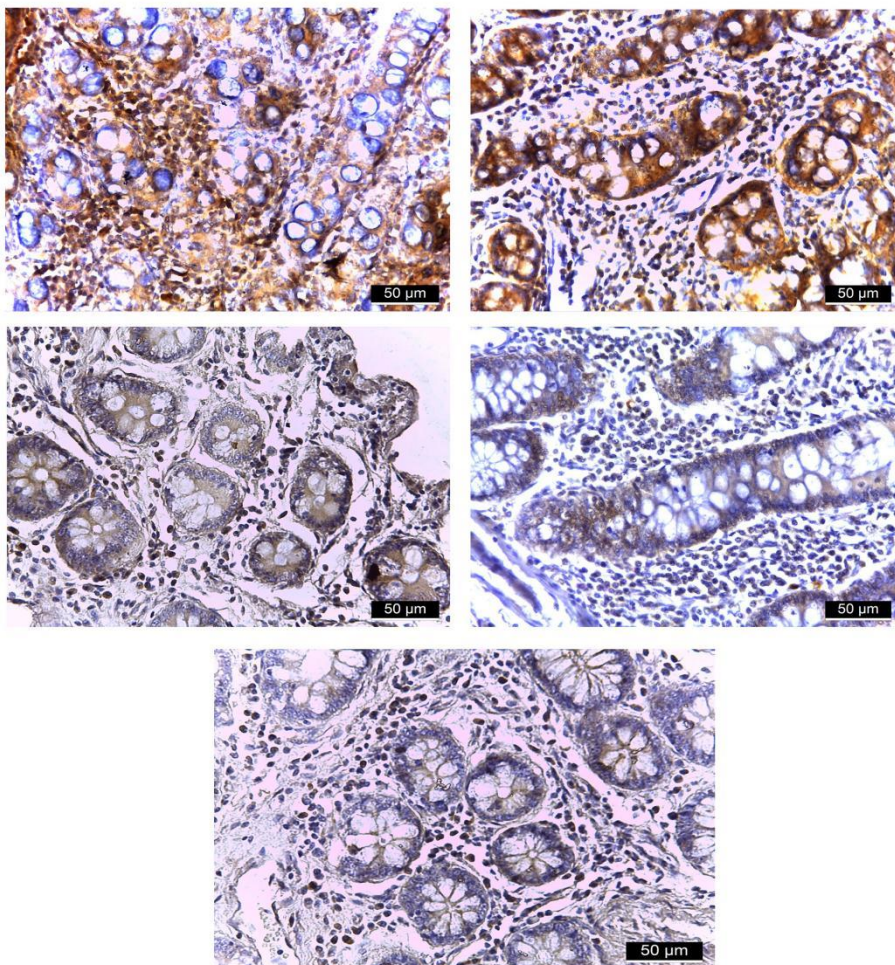


Figura 8.12. Expresia IHC a markerului MHC-II în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1.

Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3.

Expresie slabă în lamina propria, în glandele Lieberkühn și în muscularis mucosae. Colorație IHC anti MHC-IIx100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.12. IHC expression of the MHC-II marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1.

Strong expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (C) Experimental group 2 and (E)

Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria, Lieberkühn's glands and muscularis mucosae. IHC anti MHC-IIx100 staining (A, B, C, D, E)

Expresia IHC a markerilor Nrf2 și p65 la nivelul duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la porcii hrăniți cu polifenoli din pudră de tescovină de struguri negri este redată în Tabel 8.2.

Tabel 8.2.

Expresia IHC a markerilor Nrf2 și p65 la nivelul duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la porcii hrăniți cu pudră de tescovină de struguri negri

Table 8.2.

IHC expression of Nrf2 and p65 markers in the duodenum, jejunum, ileum and cecum of pigs fed black grape tescovin powder

Marker	Organ	LM	LE1	LE2	LE3	LE4
Nrf2	duoden	+	+	++	+++	++
	jejun	+	+	++	+++	++
	ileon	++	++	++	+++	++
	cecum	+	+	++	+++	++
p65	duoden	+++	++	++	+	+
	jejun	+++	+++	++	+	++
	ileon	+++	++	++	++	++
	cecum	+++	+++	++	+	+

Pentru a evalua potențialul redox al polifenolilor din strugurii negri, sunt analizați simultan, din punct de vedere IHC, următorii doi markeri: Nrf2 și p65. Rezultatele obținute indică faptul că atât p65 cât și Nrf2 au variat în funcție de doza de tescovină adăugată în furaj (Tabel 8.2.).

Expresia Nrf2 în duoden a fost slabă pentru LM și LE1, moderată la LE2 și LE4; și foarte puternică la LE3 care a fost hrănit cu doza de 10g/kg pudră de testcovină de struguri negri (Figura 8.13). În jejun și cecum s-au obținut aceleași rezultate ca și în duoden (Figura 8.14), (Figura 8.16). În ileon, LM, LE1, LE2 și LE4 sunt aproximativ egale în urma analizei calitative a colorației ICH pentru Nrf2, având o expresie moderată în mucoasa intestinală. Din nou, LE3 a avut cel mai bun rezultat în ileon (Figura 8.15.). Per total, polifenolii din tescovina de struguri negri au crescut expresia Nrf2 la doza de 10g/kg.

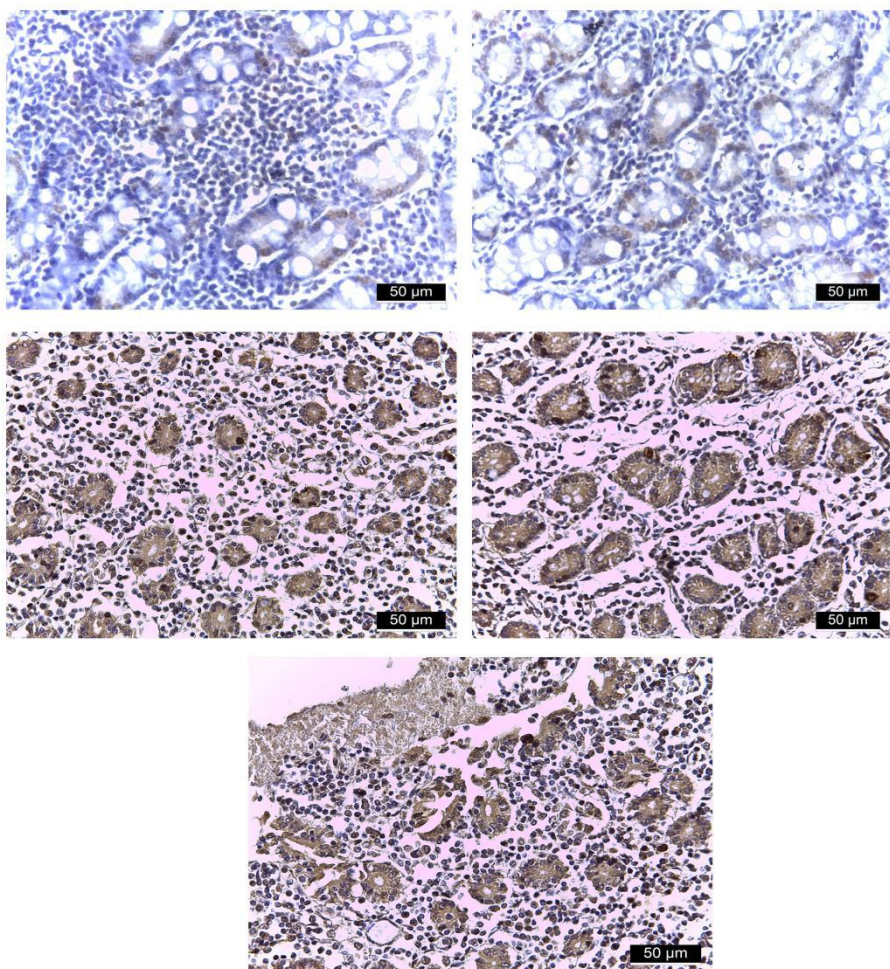


Figura 8.13. Expresia IHC a markerului Nrf2 în duoden. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti Nrf2 x400 (A, B), anti Nrf2 x100 (C, D, E)

Figure 8.13. IHC expression of Nrf2 marker in the duodenum (A) Control group and (B) Experimental group 1. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. IHC staining anti Nrf2x400 (A, B), anti Nrf2x100 (C, D, E)

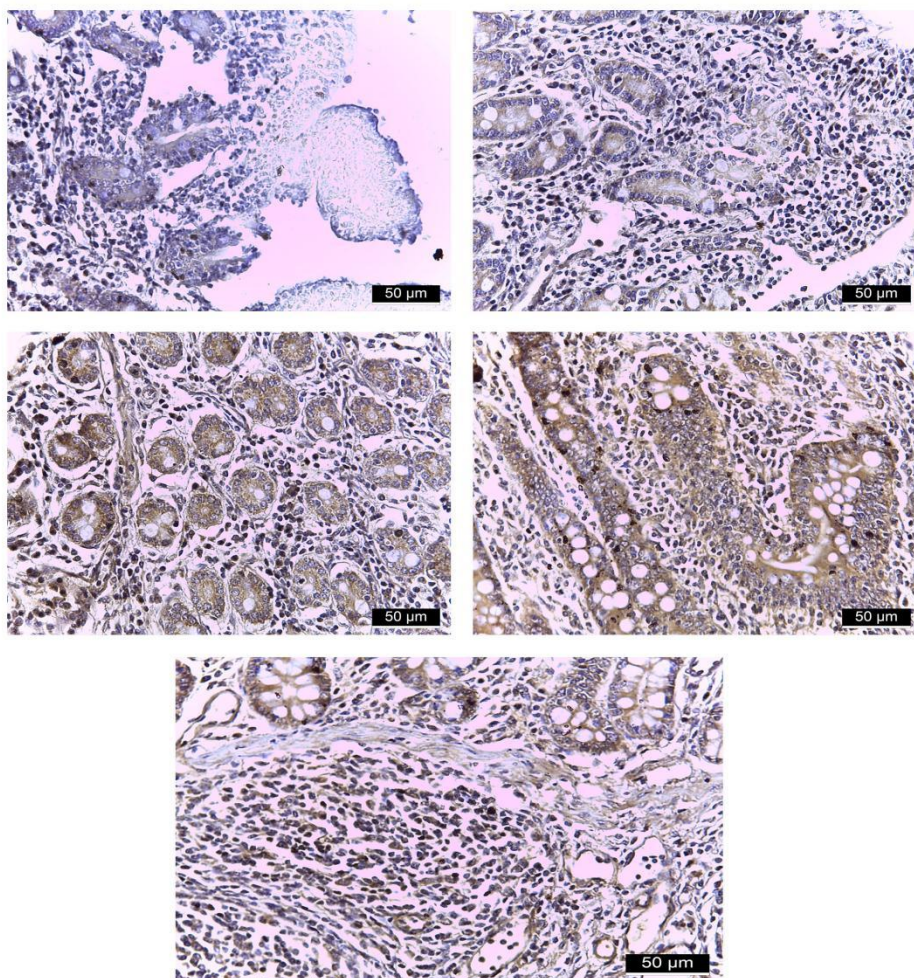


Figura 8.14. Expresia IHC a markerului Nrf2 în jejun. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria, în glandele Lieberkühn și muscularis mucosae. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în lamina propria. Colorație IHC anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.14. IHC expression of Nrf2 marker in the jejunum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria, Lieberkühn's glands and muscularis mucosae. (D) Experimental batch 3. Strong expression in Lieberkühn glands and lamina propria. IHC staining anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)

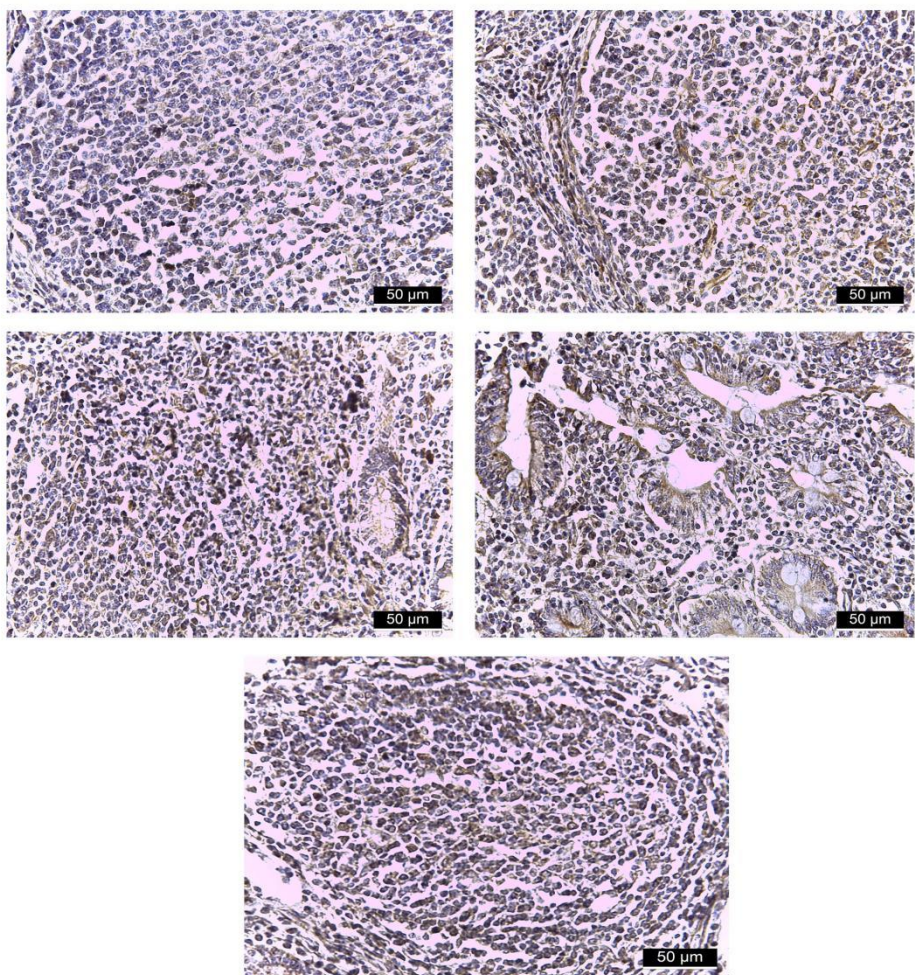


Figura 8.15. Expresia IHC a markerului Nrf2 în ileon. (A) Lotul martor, (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în lamina propria. Colorație IHC anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.15. IHC expression of the Nrf2 marker in the ileum. (A) Control group, (B) experimental group 1, (C) experimental group 2 and (E) experimental group 4. Moderate expression in lamina propria. (D) Experimental group 3. Strong expression in Lieberkühn glands and lamina propria. IHC staining anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)

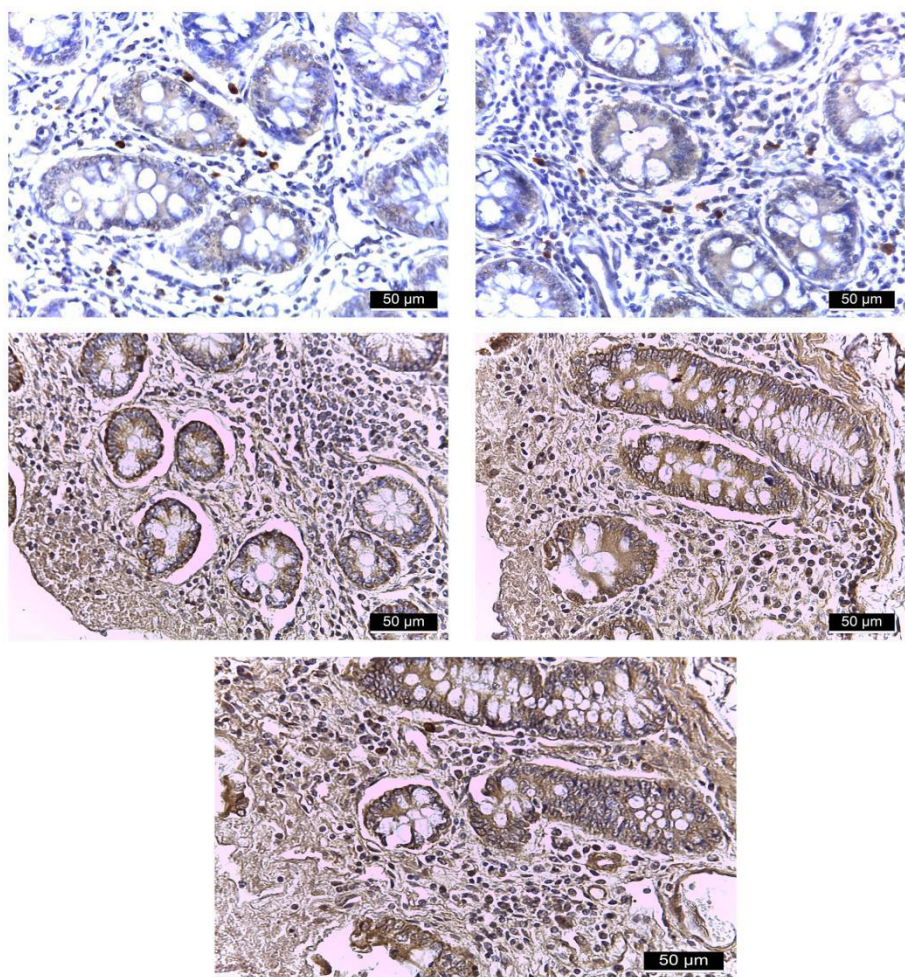


Figura 8.16. Expresia IHC a markerului Nrf2 în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4.

Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în lamina propria. Colorație IHC anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.16. IHC expression of the Nrf2 marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1.

Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (C) Experimental group 2 and (E)

Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3. Strong expression in Lieberkühn glands and lamina propria. IHC staining anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)

Expresia p65 în duoden a fost puternică la LM, moderată la LE1 și LE2 și slabă la LE3 (Figura 8.17.). În jejun, LM și LE1 sunt egale în puterea mare de expresie a lui p65, de asemenea LE2 și LE4 sunt la fel în expresia moderată a p65. Cea mai slabă colorare a markerului p65 a fost la LE3 (Figura 8.18.). În ileon, p65 s-a colorat cel mai intens la LM și moderat la restul loturilor experimentale (Figura 8.19.). În cecum, expresia p65 a fost cea

mai puternică la LM și LE1, moderată la LE2 și cea mai slabă la LE3 și LE4 (Figura 8.20.).
Per total, polifenolii din tescovina de struguri negri au redus expresia p65 la doza de 10g/kg.

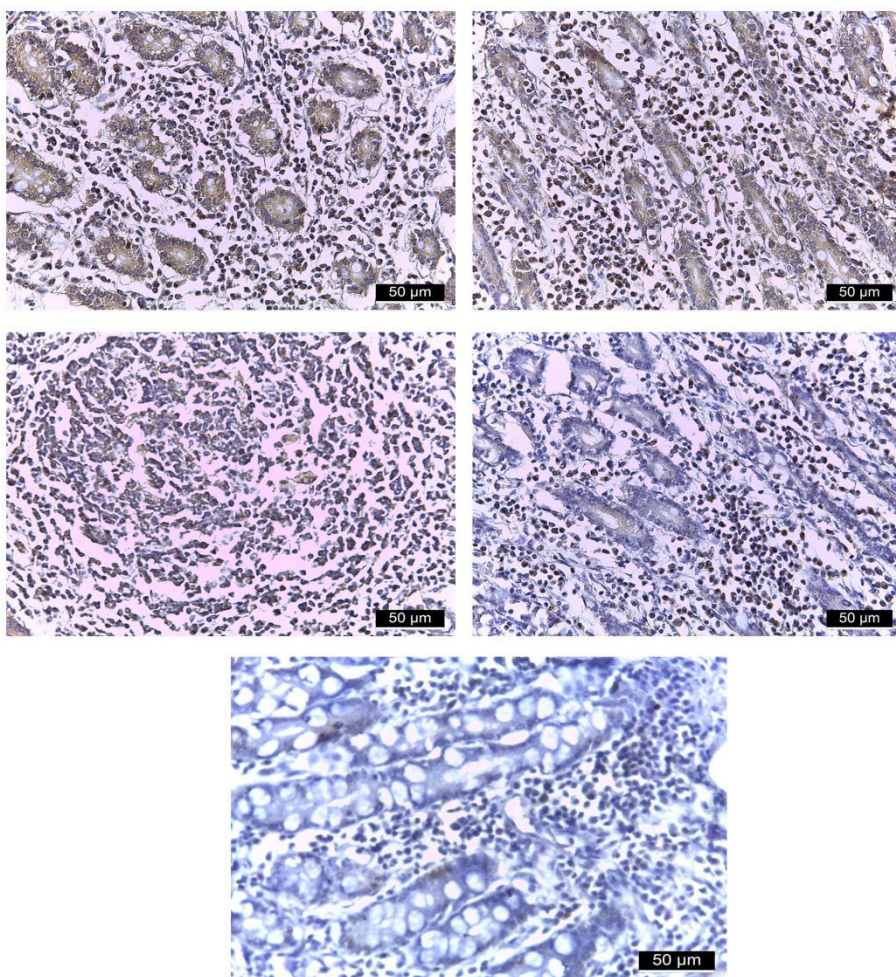


Figura 8.17. Expresia IHC a markerului p65 în duoden. (A) Lotul martor. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în spațiul periglandular. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.17. IHC expression of the p65 marker in the duodenum. (A) Control group. Strong expression in Lieberkühn's glands and periglandular space. (B) Experimental batch 1 and (C) Experimental batch 2. Moderate expression in the lamina propria. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E)

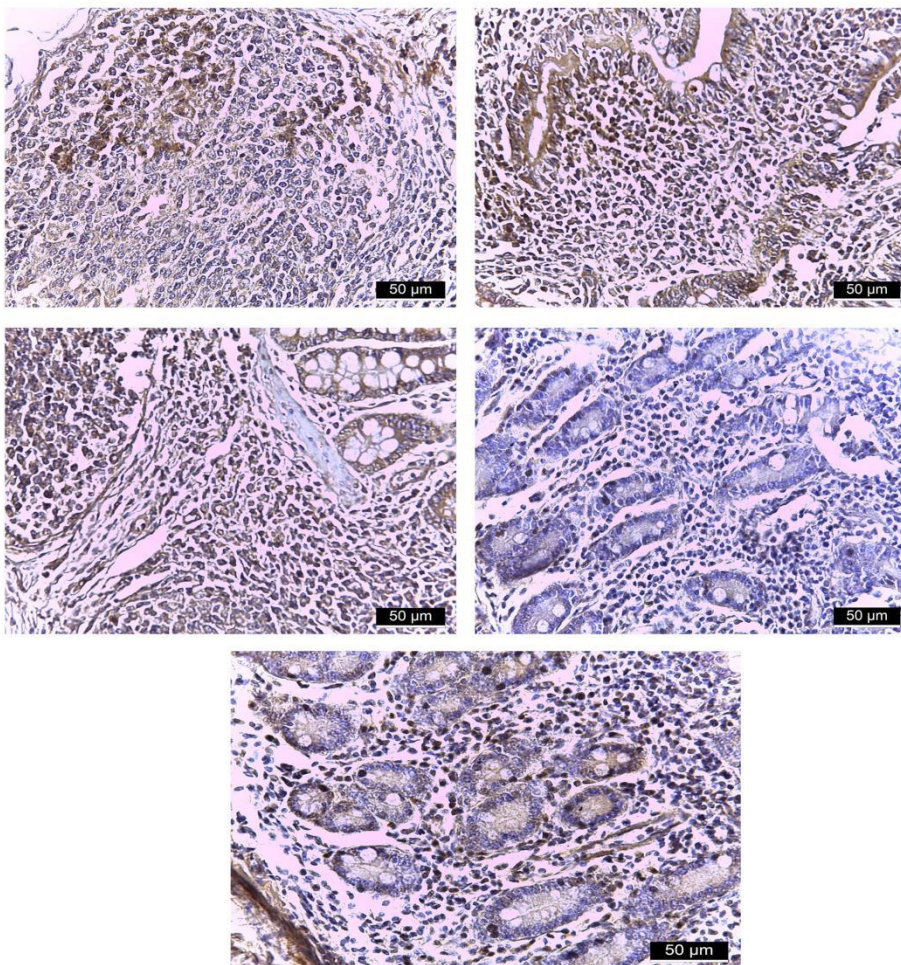


Figura 8.18. Expresia IHC a markerului p65 în jejun. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în epiteliul columnar și lamina propria. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în glandele intestinale, muscularis mucosae și lamina propria. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele intestinale. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.18. IHC expression of the p65 marker in the jejunum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Strong expression in columnar epithelium and lamina propria. (C) Experimental 2 and (E) Experimental 4. Moderate expression in intestinal glands, muscularis mucosae and lamina propria. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and intestinal glands. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E)

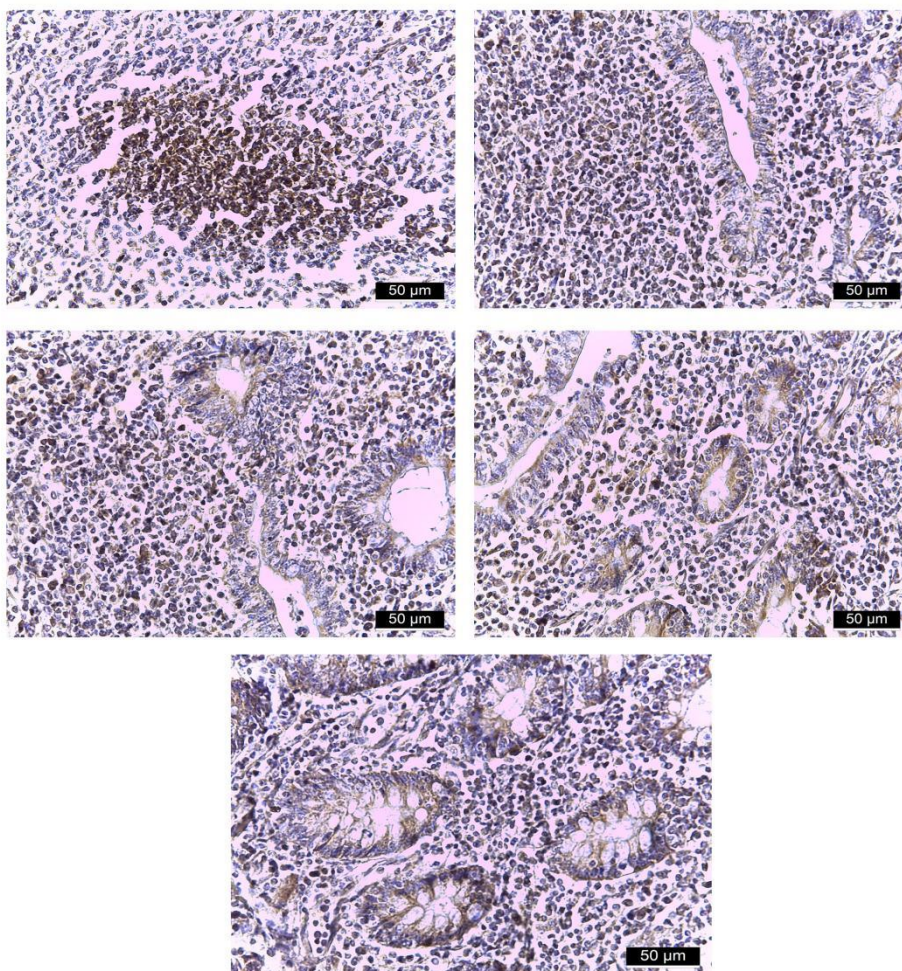


Figura 8.19. Expresia IHC a markerului p65 în ileon. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2 (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în glandele intestinale și lamina propria. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.19. IHC expression of the p65 marker in the ileum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria. (B) Experimental group 1 and (C) Experimental group 2 (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in intestinal glands and lamina propria. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E)

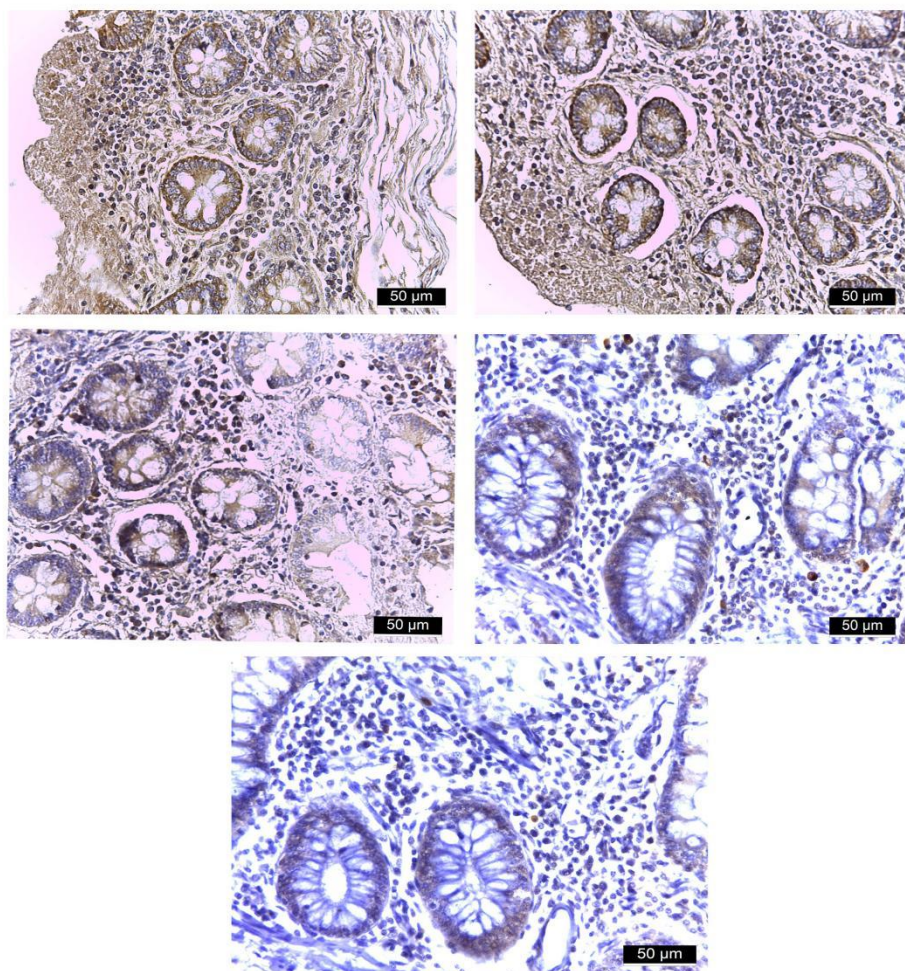


Figura 8.20. Expresia IHC a markerului p65 în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în epiteliul columnar, lamina propria și muscularis mucosae. (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în glandele intestinale și lamina propria. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie slabă în lamina propria și în glandele intestinale. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E)

Figure 8.20. IHC expression of the p65 marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1. Strong expression in columnar epithelium, lamina propria and muscularis mucosae. (C) Experimental group 2. Moderate expression in intestinal glands and lamina propria. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Weak expression in lamina propria and intestinal glands. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E)

8.3. Discuții

Pentru nutriția animalelor de fermă, tescovina de struguri cu sau fără semințe, obținute ca subproduse agroindustriale din vinificație sunt surse sigure și ieftine de polifenoli. Cei mai abundenți polifenoli din semințele de struguri sunt proantocianidinele, epigallocatechina, epigallocatechina-3-galat, epicatechina, epicatechina-3-galat, catechina și

acidul galic (Auger și col., 2004). Tescovina de struguri conține mai puține procianidine, dar conține cantități semnificative de antociani care sunt absente în semințele de struguri (Auger și col., 2004). Datorită activităților lor antioxidante și de captare a radicalilor liberi, tescovina de struguri este utilizată ca aditiv furajer pentru stabilizarea oxidativă a furajelor.

Există numeroase studii care investighează efectul compușilor din struguri asupra inflamației intestinale, dar majoritatea se concentrează pe acțiunea unui singur compus (de exemplu, resveratrolul sau proantocianidinele) sau a unui grup (polifenoli) și se știe mai puțin despre efectul întregului complex de compuși din această sursă și de posibila activitate combinatorie a lor. Efectele antiinflamatorii atribuite interacțiunii sinergice dintre compușii bioactivi din dieta cu tescovină de struguri negri reies și din rezultatele obținute în urma experimentului nostru. O dietă bogată în compuși antiinflamatori, așa cum este tescovina de struguri negri, poate avea un rezultat terapeutic identic sau poate fi un ajutor eficient pentru o terapie reușită (Molendijk și col., 2019). De exemplu, suplimentarea dietei cu un extract fenolic din semințe de struguri (1%) a atenuat răspunsurile inflamatorii în colonul șoarecilor cu colită indusă, prin scăderea nivelului de ARNm al principalilor mediatori inflamatori, TNF- α , IL-1 β , IL-6 și IFN- γ (Wang și col., 2013). Gessner și col., (2017) au raportat că suplimentarea dietei cu un extract de semințe de struguri și tescovină de struguri, bogate în polifenoli, a redus activitatea markerilor de inflamație în mucoasa duodenală a purceilor. Similar cu acest studiu, Miller și col. (2018) dar și Pistol și col., (2020) au constatat că dieta cu tescovină de struguri a determinat o reducere a genelor citokinelor pro-inflamatorii în intestinul porcilor. În aceeași linie, Fiesel și col., (2014) au demonstrat că hrănirea cu extract de semințe de struguri bogat în polifenoli și făină de tescovină de struguri determină o reglare în jos a citokinelor pro-inflamatorii ICAM1, IL-1 β , TNF- α și IL-8 în mucoasa diferitelor segmente ale intestinului de porc: duoden, ileon și colon. Știind că un nivel bazal de inflamație este necesar în organism, inflamația fiind implicată în diferite funcții fiziologice, acest efect și relevanța sa trebuie să fie investigate în continuare.

Citokine precum TGF- β , IL-1 α și IL-6 sunt exprimate constitutiv de epiteliul intestinal și pot juca un rol în influxul bazal al celulelor imune în mucoasă, în creșterea celulelor epiteliale și în homeostazie (Stadnyk, 1994). Alte citokine precum IL-8, IL-1 β și TNF- α sunt, de asemenea exprimate de celulele epiteliale normale și sunt mult crescute în răspuns la infecția microbiană (Jung și col., 1995; Lallès și col., 2004). Expresia locală a ARNm IL-1, IL-6 și TNF- α a fost larg documentată după o infecție bacteriană sau virală la

porci (Fossum, 1998; Murtaugh și col., 1996). În studiul nostru, TNF- α a fost intens exprimat la LM. Procesul de inflamație este autolimitat deoarece producția de citokine pro-inflamatorii este urmată aproape imediat de producția de citokine antiinflamatorii precum IL-10 și IL-13 (Philpott și Ferguson, 2004). Expresiile ARNm TNF- α și NF- κ B reacționează în mod comparabil în majoritatea țesuturilor și organe. TNF α este o citokină puternică produsă de multe tipuri de celule, inclusiv macrofage, limfocite, fibroblaste și keratinocite, ca răspuns la inflamații, infecții, leziuni și alte provocări de mediu (Baud și Karin, 2001). Expunerea celulelor la TNF- α poate duce la activarea unei cascade de caspaze care duce la apoptoză (Chang și Yang, 2000). TNF- α determină activarea a doi factori de transcripție majori, AP-1 și NF- κ B, care la rândul lor, induc gene implicate în răspunsurile inflamatorii cronice și acute (Barnes și Karin, 1997; Shaulian și Karin, 2001).

De remarcat, aceste gene sunt reglementate de factorul nuclear κ B (NF- κ B), regulatorul principal al inflamației (Barnes și Karin, 1997; Li și Verma, 2002; Rogler și col., 1998). Mai multe studii in vitro sau in vivo, efectuate în principal pe modele rozătoare cu colită acută sau cronică, au arătat deja că polifenolii alimentari sunt capabili să acționeze antiinflamator prin inhibarea transactivării NF- κ B (Biesalski, 2007; Gessner și col., 2013; Rahman și col., 2006; Romier și col., 2009). NF- κ B este principalul regulator transcripțional cheie al multor citokine proinflamatorii (Baldwin Jr, 1996; Ghosh și Karin, 2002). Cu toate acestea, activarea NF κ B promovează și proliferarea celulară (Guttridge și col., 1999; Hinz și col., 1999) și protejează împotriva apoptozei (Beg și Baltimore, 1996; Van Antwerp și col., 1996).

La mamifere, familia NF- κ B cuprinde cinci proteine, inclusiv p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B 1) și p100/p52 (NF- κ B 2), care se asociază între ele pentru a forma complexe homo- și heterodimerice distincte din punct de vedere transcripțional, heterodimerul p65:p50 este cel mai abundent și cel mai relevant pentru inflamație (Li and Verma, 2002). În celulele în repaus, heterodimerul p65:p50 NF- κ B este sechestrat în citoplasmă prin legarea de proteina sa inhibitoare, IkappaB (IkB). Ca răspuns la un stimul inflamator, cum ar fi LPS, calea clasică de activare a NF- κ B duce la activarea kinazei IkB (IkkB), un membru al complexului IKK, declanșând fosforilarea IkB -a (pIkB-a) (Hayden și col., 2006). Apoi, pIkB-a este recunoscută de ubiquitin ligază, rezultând în poliubiquitinarea sa și degradarea proteasomală ulterioară. După degradarea pIkB-a, heterodimerii p65:p50 sunt capabili să se transloce în nucleu, unde se leagă de κ B care se găsește în regiunile promotoare

sau amplificatoare ale multor gene proinflamatorii pentru a le induce expresia (TNF- α , IL-6, IL-1 α) (Barnes și Karin, 1997; Collins și col., 1995; Hayden și col., 2006; Saha și col., 2007).

NF- κ B intestinal a fost considerat mult timp că este asociat în mod specific cu țesutul limfoid asociat intestinului. Cu toate acestea, s-a stabilit în prezent că NF- κ B este prezent și în celulele epiteliale intestinale, care sunt principala componentă celulară a mucoasei intestinale, și că NF- κ B epitelial este esențial pentru menținerea funcției și integrității barierei epiteliale intestinale prin reglarea în sus a genelor implicate în apărarea antimicrobiană și atenuarea stresului oxidativ (Ben-Neriah și Schmidt-Supprian, 2007). O activare exagerată a NF- κ B în intestinului duce la inflamație intestinală, deteriorarea țesuturilor, creșterea permeabilității intestinale și tulburări intestinale (McKay și Baird, 1999).

Date fiind efectele nefavorabile ale inflamației intestinale prin atrofierea vilozităților, perturbarea capacității digestive a intestinului și a ratelor de creștere ale animalelor (McCracken și col., 1999), controlul inflamației intestinale determinate de NF- κ B este o abordare rezonabilă pentru prevenirea tulburărilor intestinale și menținerea caracteristicilor de performanță ale animalelor de fermă. De exemplu, extractele de cacao sau flavonoidele singure (catechin, epicatechin) au scăzut producția de citokine inflamatorii TNF- α , IL-8, IL-6, MCP-1 în macrofagele stimulate și în celulele sanguine întregi (Pérez-Cano și col., 2013); resveratrolul, un polifenol activ prezent în struguri, a exercitat un efect chimioprotector asupra carcinogenezei hepatice la șobolani prin scăderea citokinelor proinflamatorii (Mbimba și col., 2012). Polifenolii din ceaiul verde, de asemenea reduc producția de citokine inflamatorii (TNF- α , IL-6, IL-1 β) și inhibă calea de semnalizare TLR4 (Li și col., 2020). Cho și col., (2013) au sugerat că reglarea în jos a NF- κ B, factorul de semnalizare a transcripției, care activează transcrierea genelor care codifică citokinele proinflamatorii (Pérez-Cano și col., 2013) poate fi unul dintre mecanismele prin care compușii bioactivi din struguri își produc efectele în ficat (Cho și col., 2013). Mai mult, alte studii au demonstrat că mecanismul inhibitor produs de compușii din struguri a inhibat întreaga cascadă inflamatorie, inclusiv MAPK în citoplasmă și NF- κ B în nucleu (Chuang și col., 2011; Fraga și Oteiza, 2011; Park și col., 2012; Rahman și col., 2006). Rezultatele lui Taranu și col., (2017) arată că extractul din sâmburi de struguri a redus expresia genetică a NF- κ B și a genelor țintă ale acesteia (citokine proinflamatorii, COX2, iNOS și eNOS), iar testul de imunotranslație a validat inhibarea translocării NF- κ B, forma nucleară fiind cea mai redusă. Este de presupus că acest rezultat ar putea fi, de asemenea, o acțiune sinergică cu celelalte substanțe fitochimice din sâmburii de struguri, cum ar fi PUFA,

cunoscute pentru un efect antiinflamator (Farmer și col., 2010; Hur și col., 2012; Taranu și col., 2014; Zhan și col., 2009) prin afectarea stării de fosforilare a receptorilor nucleari (Eder și col., 2002; Umezawa și col., 2000; Xu și col., 2006).

Deși un efect inhibitor direct al polifenolilor asupra activității NF- κ B a fost bine stabilit, este posibil ca efectele antiinflamatorii observate în acest studiu să se datoreze, cel puțin parțial, efectelor antimicrobiene ale produselor vegetale bogate în polifenoli. Faptul că efectele antiinflamatorii au fost observate nu numai în duoden, ci și în jejun, ileon și cecum indică faptul că componentele active ale produselor vegetale bogate în polifenoli nu au fost complet absorbite sau degradate în partea anterioară a intestinului subțire, dar au fost cel puțin parțial disponibile și active în părțile posterioare ale intestinului. S-a demonstrat că bacteriile asociate mucoaselor pot declanșa transcrierea genelor proinflamatorii prin invadarea celulelor epiteliale, interacțiunea cu receptori specifici sau prin inhibarea sau activarea directă a activității transcripționale NF- κ B (Kelly și col., 2004; Lakhdari și col., 2011; Ohkusa și col., 2009). Indiferent de modul exact de acțiune al inhibării NF- κ B, studiul de față confirmă conceptul conform căruia polifenolii alimentari ar putea oferi o strategie alimentară utilă pentru inhibarea inflamației în intestinul porcinelor.

Celulele dendritice (DC) sunt cele mai puternice celule prezentatoare de antigen (APC) localizate în țesuturi precum pielea și membranele mucoase și joacă un rol esențial în activarea răspunsurilor imune dependente de celulele T (Banchereau și Steinman, 1998). DC preiau antigenii exogeni, îi transformă în peptide imunogene și exprimă aceste peptide pentru a le prezenta pe complexul de histocompatibilitate (MHC) clasa II pentru a iniția răspunsuri imune. De asemenea, s-a postulat că DC sunt importante pentru inducerea toleranței imunologice (Shortman și Heath, 2001).

Recent s-a subliniat faptul că factorii dietetici ar putea contribui la prevenirea și tratarea bolilor alergice. Au fost demonstrate efectele antialergice ale probioticelor, prebioticelor și ale polifenolilor alimentari (Johannsen și Prescott, 2009; Roży și col., 2012; Singh și col., 2011). Akiyama și col., (2005) au raportat că extractul de polifenoli din măr inhibă dezvoltarea alergiilor alimentare în modele murine. Se presupune că polifenoli din măr are un efect supresiv direct asupra prezentării antigenului de către APC, cum ar fi DC prin inhibarea expresiei la suprafața celulară a MHC-II și a moleculelor costimulatoare, ceea ce duce la o prezentare inefficientă a antigenului, și exercită un efect antialergic. Rezultate asemănătoare s-au obținut și în acest experiment unde compușii bioactivi din tescovină de

struguri au reglat în jos expresia IHC a lui MHC-II de-a lungul experimentului. Cea mai slabă colorare este obținută la LE3 care a primit în furaj 10g/kg pudră de tescovină. De asemenea, galatul de epigallocatechină induce apoptoza și afectează fenotipul al DC în curs de dezvoltare. Moleculele care sunt esențiale pentru prezentarea antigenului de către DCs, cum ar fi cum ar fi CD83, CD11c, CD80, și complexul major de histocompatibilitate MHC-II, sunt reglementate în jos de galatul de epigallocatechină, sugerând o acțiune imunosupresoare (Yoneyama și col., 2008). Alți polifenoli precum curcumină, quercetină, apigenină, silibinină și polifenoli de mure provoacă inhibarea maturării DC derivate din măduva osoasă murină și a expresiei moleculelor MHC, reducerea absorbției antigenului și scăderea secreției de citokine pro-inflamatorii interleukinele IL-1, IL-2, IL-12, IL-6 (Gupta și col., 2014; Huang și col., 2010; Lee și col., 2007; Yoon și col., 2006). Un studiu efectuat pe un model animal a arătat că administrarea de fisetină (50 mg/kg) a scăzut migrația DC și capacitatea de alo-stimulare a DC (Liu și col., 2010). În contextul imunomodulator al DCs, quercetina a fost capabilă să inhibe activarea BMDCs indusă de LPS prin scăderea expresiei moleculelor de adeziune și costimulatoare (CD40, CD80, CD86 și MHC-II) și producția de mediatori proinflamatori (TNF- α , NO, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, CCL3, CCL4 și CCL5) (Ho și col., 2017; Huang și col., 2010). Kaempferolul a fost capabil să moduleze răspunsul imun prin inhibarea maturării DC (Lin și col., 2011). În special, acest flavonoid afectează expresia moleculelor de adeziune și costimulatoare (CD40, CD80, CD86 și MHC-II), precum și producția mediatorilor proinflamatori (NO, TNF- α , IL-6, IL-12p70, CCL2, CCL4 și CCL5) în DCS stimulate de LPS (Ho și col., 2017; Lin și col., 2011). Capacitatea DCs de a promova activarea celulelor T specifice antigenului a fost, de asemenea, abrogată de kaempferol (Lin și col., 2011). Resveratrolul (trans-3,5,40-trihidroxystilbene) este un stilben vegetal prezent în principal în vinul roșu, struguri și arahide. Acesta influențează genele reglatoare ale ciclului celular prin modularea a numeroase ținte celulare, cum ar fi activarea factorilor de transcripție, inhibarea proteinelor kinazelor, suprimarea genelor antiapoptotice și a produselor angiogenice și reglarea în jos a biomoleculelor inflamatorii (Švajger și col., 2010). Resveratrolul a fost identificat ca afectând diferențierea DC umane din monocite, cu un potențial puternic de acțiune de reglementare (Dzik, 2000).

Cu toate acestea, descoperirea recentă a lui Gessner și col., (2016) a arătat că semințele de struguri și extractul de tescovină de struguri nu au avut niciun efect sau au avut un efect redus asupra expresiei genelor implicate în inflamație, citoprotecție și metabolismul

xenobiotic la porci. O explicație ar putea fi faptul că studiul lui Gessner a utilizat animale sănătoase, în timp ce efectul antiinflamator al compușilor din struguri a fost observat în principal la animalele provocate de tratamente proinflamatorii și pro-oxidative (Gessner și col., 2017). Efectul antiinflamator constatat în studiul nostru s-ar putea datora faptului că animalele se aflau în faza de îngrășare (porci în vârstă de 180 de zile) și este bine stabilit faptul că obezitatea implică o componentă inflamatorie. Ficatul obez ar putea fi mai sensibil la efectul polifenolilor.

TBARS-MDA este principalul produs secundar al peroxidării lipidelor, iar studiile anterioare au raportat că antioxidanții (flavonoide, fenoli, PUFA) din extractele de struguri sau din subprodusele din struguri sunt capabili să controleze și să diminueze nivelul TBARS prin capacitatea lor de a capta radicalii liberi (Giribabu și col., 2015; Goutzourelas și col., 2014). La porci, studiul lui Zhang și col., (2014) s-a arătat că suplimentarea dietei cu o combinație de extracte de plante, inclusiv semințe de struguri (2 g/kg), a fost eficientă în reducerea formării de TBARS în plasma porcelor înțărcați, dar fără efect asupra capacității antioxidante totale. În studiul lui Gessner și col., (2013), semințele de struguri și tescovină de struguri nu au influențat concentrația de TBARS în plasma și ficatul porcelor și nici capacitatea antioxidantă din plasmă. În lucrarea lui Taranu și col., (2018), TBARS-MDA și capacitatea antioxidantă în ficatul porcelor hrăniți cu dieta din sămănuri de struguri, nu au fost diferite în comparație cu porcii de control. Din mai multe studii efectuate până în prezent, (Gessner și col., 2013), au concluzionat că polifenolii vegetali au un efect mai redus asupra capacității antioxidante la animalele sănătoase, de asemenea, din cauza biodisponibilității lor scăzute, prin urmare, concentrația plasmatică și tisulară scăzută. În schimb, acestea îmbunătățesc starea antioxidantă sistemică și nivelurile de ROS la animalele stresate prin acțiunea lor antiinflamatorie sistemică (Hou și col., 2014; Wang și col., 2008). Enzimele antioxidante endogene SOD, GPx și CAT sunt principalii parametri implicați în apărarea celulară împotriva radicalilor liberi (Cui și col., 2014; Rhoși Kim, 2006). Numeroase studii au ilustrat capacitatea polifenolilor și a altor compuși bioactivi de a spori expresia genetică și activitatea acestor enzime (Cheng și col., 2013; Hao și col., 2015) prin activarea Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor-2), un factor de transcripție sensibil la redox care modulează sistemul de apărare antioxidantă prin legarea la ARE (elemente de răspuns antioxidant) și prin inducerea rapidă a enzimelor antioxidante (Gessner și col., 2013; Nitire și col., 2010).

Calea Nrf2 este un punct fierbinte în domeniul cercetării antioxidante în ultimii ani. Direcționarea semnalizării Nrf2-stres antioxidant este o strategie ideală pentru prevenirea sau tratarea bolilor legate de stresul oxidativ (Cuadrado și col., 2014; Taguchi și col., 2011; Yang și col., 2013). În plus, a fost dovedit de un număr mare de studii că unele extracte de plante ar putea fi potențiali inductori ai căii Keap1-Nrf2 (Chen și col., 2014; Pall și Levine, 2015; Pandey și Tripathi, 2010; Sohel și col., 2018; Xiao și col., 2013; Zhai și col., 2013). Calea Nrf2 este esențială pentru reglarea stării intracelulare de reducere/oxidare (REDOX) (Chen și col., 2006). În condiții fiziologice normale, Nrf2 este ancorată în citoplasmă prin legarea de Keap1, care este atașată la citoscheletul de actină, pentru a menține enzima citoprotectoare și antioxidantii la nivelurile de expresie de bază și celulele într-o stare stabilă. Atunci când producția de radicali liberi este crescută, Keap1 este transformat în tiol Keap1 și/sau Nrf2 este fosforilat de protein kinază și eliberat din Keap1 și translocat în nucleu, activând astfel expresia enzimelor antioxidante (Kaspar și col., 2009; Wen și col., 2019). Aceasta înseamnă că Nrf2 activat poate proteja celulele împotriva oxidanților (Ma, 2013).

Diverse studii arată că polifenolii au potențialul de a activa Nrf2 și, la rândul lor, de a crește expresia mai multor gene antioxidative și citoprotectoare în intestinul subțire (Cheng și col., 2013; Scapagnini și col., 2011). Majoritatea flavonoidelor sunt slab absorbite prin bariera intestinală (Scalbert și col., 2002), astfel încât intestinul este locul principal al apărării antioxidante oferite de flavonoide (Halliwell și col., 2000). Factorul 2 legat de NF-E2 (Nrf2) este un factor cheie în răspunsul la stresul oxidativ și extrem de exprimat în tractul gastrointestinal. Acesta joacă un rol important în medierea stresului oxidativ în intestinul subțire și în stomac (Cuadrado și col., 2014; Yang și col., 2013). Dacă Nrf2 este dezactivat sau absent, nivelul de expresie al enzimelor antioxidante din aval este redus, iar toxicitatea stresului oxidativ nu poate rezista, ceea ce duce la disfuncții celulare, apoptoză sau necroză. Cu toate acestea, există studii care arată că polifenolii derivați din diferite deșeuri exercită un efect inhibitor asupra enzimelor antioxidante (Bobek și col., 1998), care pare să fie dependent de doză. O doză mare de polifenoli din ceaiul verde a redus expresia enzimelor antioxidante, în timp ce dozele mici și medii au crescut-o (Inoue și col., 2013). Acest rezultat este obținut și de noi în acest experiment. Expresia IHC a lui Nrf2 a fost cea mai mare la doza de 10g/kg tescovină în furaj, doza de 1g/kg având rezultate asemănătoare cu LM iar dozele de 5g/kg și 15g/kg fiind inferioare și având o expresie IHC moderată.

8.4. Concluzii parțiale

În concluzie, studiul de față arată că administrarea orală a pudrei de tescovină de struguri negri, bogată în polifenoli suprimă expresia markerilor pro-inflamatori $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ și MCH-II în intestinul subțire și cecumul porcilor și, astfel, ar putea oferi o strategie dietetică utilă pentru a inhiba inflamația intestinală care apare frecvent la porci. De asemenea, tescovina de struguri negri a reglat pozitiv balansul redox între p65 și Nrf2. Intensitatea colorării IHC a markerilor pro-inflamatorii și a p65 a fost cea mai slabă la doza de 10g/kg pudră de tescovină de struguri adăugată în furaj. Cea mai intensă colorare IHC a lui Nrf2 a fost la LE3 (10g/kg), susținând puterea antioxidantă a polifenolilor din tescovina de struguri.

9. CERCETĂRI PRIVIND EVOLUȚIA PARAMETRILOR PERFORMANȚEI DE CREȘTERE A PORCILOR HRĂNIȚI CU O DIETĂ SUPLIMENTATĂ CU TESCOVINĂ DE STRUGURI NEGRI

STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF GROWTH PERFORMANCE PARAMETERS IN PIGS FED A DIET SUPPLEMENTED WITH BLACK GRAPE TESCOVIN

Suplimentele pe bază de plante și metaboliții lor secundari sunt promotori de creștere naturali alternativi care sunt utilizați pe scară largă în creșterea animalelor (Hashemi și Davoodi, 2011). Încorporarea acestor surse în dieta animalelor necesită o evaluare a efectelor și testarea rezultatelor lor, pozitive sau negative, asupra producției. Obiectivul acestui capitol este de a urmări evoluția performanței de creștere a porcilor unde sunt calculați și evaluați următorii parametri de creștere: greutatea corporală inițială, greutatea corporală finală, aportul zilnic de hrană (ADFI), creșterea zilnică a greutateii corporale (ADG) și rata de conversie a hranei (FCR) la doze crescânde de tescovină: 1g, 5g, 10g și 15g în 100 kg furaj.

9.1. Material și metodă

Calcululele pentru performanța de creștere au fost efectuate utilizând pachetul Excel Microsoft Office. Aportul zilnic de hrană (ADFI), creșterea zilnică a greutateii corporale (ADG) și rata de conversie a hranei (FCR) la fiecare lot experimental în parte au fost calculate cu ajutorul formulelor matematice. Rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ deviație standard (SEM). Pentru a evalua variația datelor între grupuri, s-a derulat ANOVA cu o singură cale. Diferențele dintre medii au fost calculate cu ajutorul testului Duncan cu intervale multiple. Un nivel semnificativ de 0,05 a fost utilizat.

9.2. Rezultate

Greutatea corporală, creșterea în greutate, aportul de hrană și rata de conversie a hranei la diferite grupe dietetice sunt prezentate în Tabelul 9.1. Greutatea corporală inițială

nu a diferit semnificativ dar greutatea corporală finală la LE2, LE3 și LE4 au fost semnificativ mai mari față de LM ($P < 0,05$). LE3 a avut cea mai mare greutate finală, semnificativ mai mare față de LE1, LE2, LE3 și LE4 ($P < 0,05$), în schimb nu s-a înregistrat nicio diferență între greutățile finale la LE1, LE2 și LE3 (Figura 9.1.).

Tabel 9.1.

Efectele pudrei de tescovină de struguri negri asupra performanței de creștere la porcii în perioada de finisare

Table 9.1.

Effects of black grape tescovin powder on growth performance of finishing pigs

	LM	LE1	LE2	LE3	LE4
Greutate inițială (kg)	85,09 ± 0,11	85,06 ± 0,15	85,08 ± 0,10	85,05 ± 0,15	85,07 ± 0,09
Greutate finală (kg)	148,34 ± 0,21 ^c	148,39 ± 0,29 ^{bc}	148,95 ± 0,01 ^b	150,77 ± 0,18 ^a	148,9 ± 0,02 ^b
ADFI (g)	2,68 ± 0,02 ^d	2,74 ± 0,01 ^c	2,75 ± 0,01 ^b	2,82 ± 0,03 ^a	2,75 ± 0,004 ^{bc}
ADG (g)	702,82 ± 2,54 ^c	703,68 ± 10,56 ^{bc}	709,72 ± 1,42 ^b	730,32 ± 2,88 ^a	709,26 ± 1,08 ^b
FCR (g/kg)	3,80 ± 0,02 ^b	3,89 ± 0,07 ^a	3,88 ± 0,02 ^a	3,86 ± 0,05 ^a	3,88 ± 0,02 ^a
Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SD (n = 10/grup). a, b, c, d - în cadrul unei linii, valorile care au același indice superior indică o diferență semnificativă ($P < 0,05$). ADFI (aportul zilnic de hrană), ADG (creșterea zilnică a greutății corporale) și FCR (rata de conversie a hranei)					

Există o creștere a aportului zilnic de hrană direct proporțional cu dozele. LE3 a avut un consum de hrană semnificativ mai mare în raport cu LM și restul loturilor experimentale ($P < 0,05$). Nu există diferență semnificativă între LE4 în raport cu LE1 și LE2 (Figura 9.1).

Adaosul zilnic a greutății corporale a crescut semnificativ la LE2, LE3 și LE4 față de LM ($P < 0,05$). Între LE1, LE2 și LE4 nu există diferențe semnificative. Cea mai mare creștere a greutății corporale a fost înregistrată la LE3, fiind semnificativ mai mare față de restul loturilor experimentale ($P < 0,05$) (Figura 9.1).

Rata de conversie a hranei a fost semnificativ mai mare la loturile experimentale în raport cu LM ($P < 0,05$). Nu s-a înregistrat nicio diferență semnificativă între LE1, LE2, LE3 și LE4 (Figura 9.1).

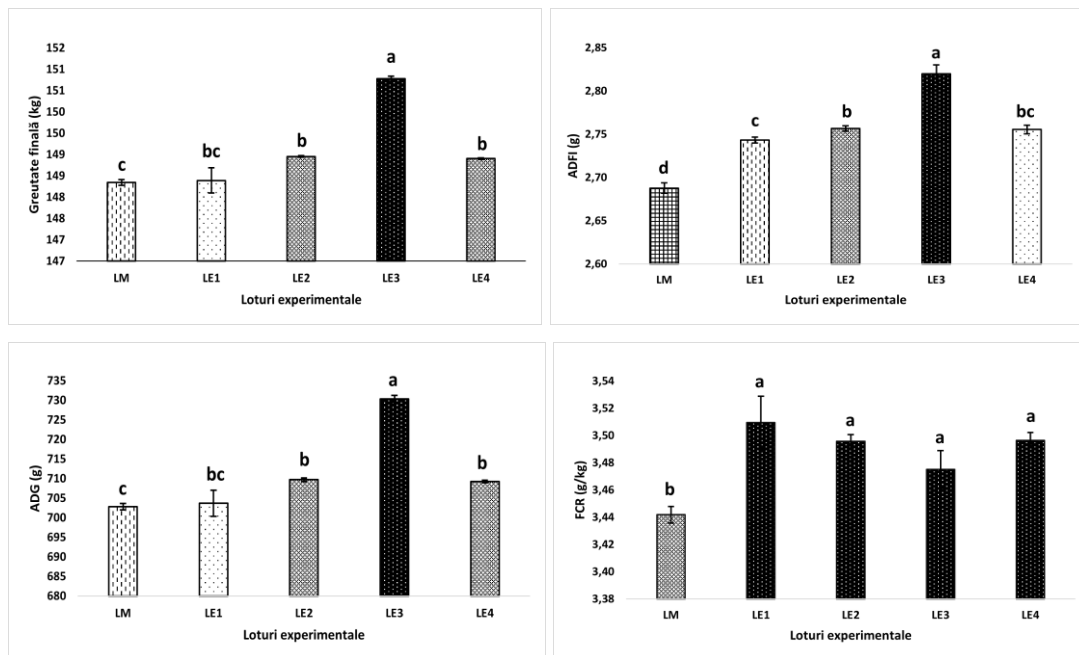


Figura 9.1. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra performanței de creștere la porci. (A) Greutatea finală, (B) ADFI = Aportul zilnic de hrană, (C) ADG = Creșterea zilnică de greutatea corporală și (D) FCR = Rata de conversie a hranei. Valorile sunt medii $\pm$ SEM, $n = 10$. Indecel superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4)

Figure 9.1. Effects of black grape tescovine polyphenols on growth performance in pigs. (A) Final body weight, (B) ADFI = Daily feed intake, (C) ADG = Daily body weight gain and (D) FCR = Feed conversion ratio. Values are means $\pm$ SEM, $n = 10$. Upper indices within each group mean significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)

9.3. Discuții

Stimulatorii de creștere au fost utilizați în producția de carne timp de mai multe decenii pentru a crește parametri precum creșterea zilnică în greutate și eficiența alimentară (Al-Dobaib și Mousa, 2009; Dikeman, 2007; Hao și col., 2014). În plus, producătorii avertizează în mod constant cu privire la eșecul pieței ca urmare a adoptării unor legi care interzic utilizarea promotorilor de creștere tradiționali, cum ar fi promotorii de creștere antibiotici (AGP) și promotorii utilizați în etapele de finisare. Din cauza acestor factori, căutarea de alternative la promotorii sintetici de creștere a început cu mai mulți ani în urmă și au fost propuse diverse alternative care oferă beneficii similare. Astfel, diverse alternative, inclusiv suplimentarea dietei cu metaboliți vegetali secundari, denumiți aditivi furajieri fitochimici, aditivi fitogenici pentru hrana animalelor, fitobiotice sau compuși vegetali și

botanici (Kommera și col., 2006; Kumar și col., 2014; Vidanarachchi și col., 2005; Wenk, 2003; Windisch și col., 2008), au fost propuse. Inițial, cercetătorii au început să experimenteze cu adăugarea de extracte din plante, cum ar fi uleiurile esențiale, iar acum experimentează cu adăugarea de compuși izolați. Utilizarea substanțelor fitochimice în hrana animalelor este acceptată de consumatori, deoarece medicamentele pe bază de plante au fost consumate de oameni timp de secole.

În prezent, substanțele fitochimice au fost propuse nu numai ca înlocuitor pentru promotorii de creștere antibiotici ci și pentru alți compuși anabolici care sunt utilizați pentru creșterea animalelor (Devi și col., 2015). Fitochimicele prezintă mai multe proprietăți biologice care le-au făcut atractive pentru utilizarea ca promotori de creștere în producția animală, inclusiv antimicrobiene, antioxidante, antistres și efecte nutrigenomice asupra dezvoltării imunității (Krause și col., 2005). Prin urmare, acești compuși sunt o sursă variată de compuși cu diferite activități biologice care au potențialul de a promova creșterea producției de animale.

Unii aditivi fitochimici sporesc gustul și palatabilitatea furajelor, ceea ce îmbunătățește consumul de furaje și performanța productivă (Bartoș și col., 2016; Janz și col., 2007). Acest rezultat poate fi legat de cu mai multe activități biologice, cum ar fi efectele antioxidante, anti-microbiene și de intensificare a aromei (Negi, 2012; Sultanbawa, 2011). Janz și col., (2007) au constatat că porcii preferă hrana suplimentată cu usturoi sau rozmarin față de hrana suplimentată cu oregano sau ghimbir. În plus, mai multe studii au raportat o scădere a consumului de hrană pentru animale ca urmare a nivelului ridicat de includere (>1500 mg/kg) a aditivilor fitochimici aditivi furajeri și a proprietăților intrinseci ale unor mâncăruri, cum ar fi un miros și o aromă puternice (Jugl-Chizzola și col., 2006; Yan și col., 2011). Astfel, nivelurile ridicate de aditivi fitochimici utilizați în hrana animalelor furajere trebuie evitate, în special în cazul speciilor porcine, din cauza palatului lor sensibil (Madsen și col., 1997). Cu toate acestea, studiile care testează aceste caracteristici sunt limitate, iar presupunerea că aditivii fitochimici îmbunătățesc palatabilitatea furajelor nu a fost încă complet justificată.

Câteva studii au evaluat adăugarea de aditivi fitochimici în toate fazele de producție a porcului; majoritatea au evaluat suplimentarea doar în fazele inițiale sau de finisare ale alimentației intensive. Fitochimicele utilizate în această specie sunt variate, dar constau predominant în extracte de plante și ierburi și, mai rar, în compuși izolați, cum ar fi acid ferulic,

resveratrol și fitoestrogeni. În acest sens, efectele pozitive asupra câștigului zilnic în greutate, aportul de hrană și conversia hranei au fost observate (Ahmed și col., 2013; Bartoš și col., 2016; Devi și col., 2015; Liu și col., 2008).

În experimentul de fata, greutatea finală, aportul de hrană zilnic, cât și creșterea zilnică în greutate au fost semnificativ mai mari la loturile experimentale față de lotul martor. Acest fenomen s-a întâmplat atunci când în hrana porcilor aflați în perioada de finisare a fost introdusă doza de 10g/kg (1%) pudră de tescovină de struguri negri. Conversia rației furajere a fost semnificativ mai mică la 1% pudră de tescovină de struguri negri, ceea ce demonstrează faptul că conversia furajelor în țesuturi este mai mare la această doză.

Efectul încorporării în alimentație a subproduselor din struguri asupra performanțelor de creștere a porcilor depinde în principal de stadiul de creștere al animalelor și de doza de subprodus pe bază uscată. În general, concentrațiile mai mici de subproduse din struguri au avut mai puține efecte asupra performanțelor de creștere, deși au depins de concentrațiile aplicate și de vârsta animalului. De exemplu, luând în considerare animale cu greutatea similară (4,8-19,3 kg), porcii suplimentați cu 9% tescovină au avut o creștere a ADG în timpul tuturor experimentelor, în timp ce cei suplimentați cu 5% nu au suferit nicio schimbare în ceea ce privește ADG. Purceii suplimentați cu 3% din subprodus și-au îmbunătățit performanțele de creștere numai în timpul etapei de creștere (36-70 de zile), posibil datorită digestibilității crescute (Yan și Kim, 2011). Pe lângă diferențele dintre condițiile de testare, tratarea prealabilă a boabelor de struguri ar trebui să fie luată în considerare, deoarece subprodusul utilizat în studiul lui Yan și Kim (2011) a fost supus unui proces de fermentație și, prin urmare, conținea un nivel ridicat de fenoli (62,1 g/mg). În plus, Kafantaris și col., (2018) au observat că 9% din reziduurile de struguri administrate purceilor timp de 30 de zile au crescut ADG, fără a afecta consumul mediu zilnic de hrană și FCR. În perioada de creștere și finisare Trombetta și col., (2019) nu au raportat niciun efect asupra ADG cu 3,5% și 7 % de tescovină de struguri. În plus, suplimentarea cu 5% din făină de în și 1% semințe de struguri nu a afectat ADG și FCR, deși a crescut ADFI (Vlaicu și col., 2019). O lipsă de efect semnificativ al extractului de semințe de struguri asupra acestor parametri a fost, de asemenea, observată atunci când purceii au fost hrăniți cu 0,015% din subprodus (Rajković și col., 2021). Cu toate acestea, o doză mare de subprodus din struguri ar putea să nu fie întotdeauna influența performanțelor de creștere la porci, deoarece purceii născuți de la scroafe hrănite cu tescovină de struguri (25 % furaj) și hrăniți cu aceeași rație înainte de înțârcare, nu au prezentat nicio

diferență în ceea ce privește ADG și FCR (Tripura și col., 2021). Chiar dacă rezultatele obținute de la un studiu la altul sunt variabile, creșterea ADG demonstrată în unele rapoarte ar trebui subliniată, deoarece este un efect promițător pentru producția animală.

9.4. Concluzii parțiale

Pe baza observațiilor din acest studiu, adăugarea diferitelor niveluri de pudră de tescovină de struguri negri a avut un efect favorabil asupra tuturor parametrilor testați. La doza de 1% greutatea finală, ADFI și ADG au fost cele mai mari, în timp ce FCR a avut valoarea cea mai scăzută. În concluzie, polifenolii din struguri administrați în concentrații mari aduc beneficii porceilor aflați la începutul perioadei de producție, iar dozele mai mici sunt benefice pentru animalele aflate în ultima perioadă a producției, așa cum sunt porcii la finisat din acest experiment.

CONCLUZII GENERALE

1. La vârsta de 180 de zile, porcii din rasa Pietrain au avut peretele jejunului și a ileonului de două mai groasă decât cel al duodenului datorită aglomerărilor limfoepiteliale din mucoasă și a foliculilor limfoizi din submucoasă.
2. În prima jumătate a jejunului, *plicae circularis* sunt mai numeroase și cu o înălțime mai mare, ca mai apoi să scadă în prima porțiune a ileonului și să dispară complet la capătul distal a ileonului.
3. Înălțimea vilozităților urmează o curbă descendentă, începând cu duodenul până la ileon.
4. Adâncimea criptelor intestinale este mai mică în ultima treime a ileonului și mai mare în treimea anterioară a ileonului, în jejun și duoden.
5. Enterocitele prezintă un ciclu de viață care începe la baza criptelor intestinale, se maturează și cresc în înălțime odată cu deplasarea lor spre apexul vilozităților, ca mai apoi să se desprindă din epiteliu.
6. Volumul celulelor caliciforme crește atât la nivelul glandelor Lieberkühn cât și în epiteliul de la suprafața vilozităților începând de la intestinului subțire și înaintând spre colon.
7. Mușchiul Bruke este foarte dezvoltat și este prezent până în apexul vilozităților intestinale.
8. Corelațiile între morfoarhitectura intestinului subțire și funcțiile neuro-endocrin-imune cresc eficiența productivă în cazul porcilor din rasa Pietrain.
9. În urma introducerii tescovinei de struguri negri în hrana porcilor, cea mai mare înălțime a vilozităților duodenale s-a înregistrat la LE3 (1%) iar cele mai mici la LM. Dintre loturile experimentale, înălțimea vilozităților cu cea mai mică valoare a fost la LE1 (0,1%).
10. Valoarea adâncimii criptelor din duoden în urma introducerii tescovinei de struguri negri a fost în creștere de-a lungul loturilor experimentale, cu cea mai mare valoare înregistrată pentru LE3 (1%). Cea mai apropiată valoare de cea a LM a fost pentru LE1.
11. Cea mai mare valoare înregistrată pentru raportul dintre înălțimea vilozităților și adâncimea criptelor în duoden a fost la LE3 (1%), iar cel mai slab raport a fost la LE1 dintre loturile experimentale.

12. Cea mai mare înălțime a vilozităților în jejun și ileon a fost la LE3 (1%), de asemenea și adâncimea criptelor intestinale și raportul dintre cele două.
13. În cadrul jejunului și a ileonului, cele mai mici valori înregistrate pentru indicii morfometrici (înălțime vilozități, adâncime cripte, raportul între ele) au fost la LE1 (0,1%).
14. Cei mai mari limfonoduli din submucoasa jejunului și a ileonului au fost măsurați în submucoasa LE3.
15. La LE3, cecumul a avut cea mai bună morfoarhitectură a mucoasei (glande intestinale lungi și numeroase celule secretoare de mucus) și cei mai numeroși limfonoduli în submucoasă.
16. Tescovina de struguri negri, bogată în polifenoli, suprimă expresia markerilor pro-inflamatori IL-1 β , TNF- α și MCH-II în intestinul subțire și cecumul porcilor.
17. Expresia IHC pentru IL-1 β a fost cea mai puternică la LE1 și LE2 în duoden; la LE1, LE2 și LE4 în jejun și la LE1 în cecum.
18. Cea mai slabă colorare IHC pentru IL-1 β a fost la LE3 și LE4 în ileon și la LE3 în cecum.
19. Expresia IHC pentru TNF- α a fost cea mai puternică la LM în toate secțiunile analizate din tubul digestiv (duoden, jejun, ileon și cecum)
20. Cea mai slabă expresie IHC pentru TNF- α a fost la LE3 și LE4 în duoden și la LE3 în jejun, ileon și cecum.
21. Expresia IHC pentru MHC-II a fost cea mai puternică la LE1 în jejun, ileon și cecum; și cea mai slabă la LE3 și LE4 în duoden și doar la LE3 în jejun și cecum.
22. Tescovina de struguri negri a reglat pozitiv balansul redox între p65 și Nrf2, susținând puterea antioxidantă a polifenolilor.
23. Expresia IHC pentru Nrf2 a fost cea mai puternică la LE3 în toate porțiunile intestinale examinate (duoden, jejun, ileon și cecum).
24. Cea mai slabă expresie IHC pentru Nrf2 a fost la LE1 în duoden, jejun și cecum.
25. Expresia IHC pentru p65 a fost cea mai puternică la LE1 în jejun și cecum.
26. Expresia IHC pentru p65 a fost cea mai slabă la LE3 și LE4 în duoden și cecum, și doar la LE3 în jejun.
27. Porcii hrăniți cu 1g/kg tescovină de struguri negri timp de 3 luni au avut cele mai mici valori pentru greutatea finală, ADFI și ADG; și cea mai mare rată de conversie a furajelor.

28. Porcii hrăniți cu 10g/kg tescovină de struguri timp de 3 luni au avut cele mai mari valori pentru greutatea inițială, DFFI și ADG. Tot LE3 a înregistrat cea mai bună rată de conversie a furajelor.
29. Pentru un avantaj economic în producția porcilor dar și pentru a asigura sănătatea intestinală, în urma cercetărilor efectuate, se recomandă introducerea în hrana porcilor aflați în perioada de finisare, cantitatea de 10g/kg tescovină de struguri negri pe o perioadă de 3 luni.
30. Datele rezultate din acest studiu alcătuiesc un punct clar și încurajator pentru introducerea subproduselor din struguri, și în special a tescovinei, în dieta porcilor pentru a modela morfostructura și răspunsul imunitar la nivel intestinal, dar și cu efect benefic asupra parametrilor productivi.

Tot mai multe studii realizate pe porci sugerează că polifenolii vegetali sunt eficienți în reducerea inflamațiilor locale și sistemice, aspecte esențiale în perioada de îngrășare a speciilor monogastrice, contribuind astfel la îmbunătățirea performanțelor animalelor. Un factor principal care explică creșterea eficienței alimentare în urma administrării polifenolilor vegetali este faptul că inflamația scade aportul de hrană, crește necesarul energetic și determină modificări hormonale care favorizează un metabolism catabolic la animalele de fermă. De asemenea, având în vedere că polifenolii sunt absorbiți slab în intestin și interacționează cu microbiota intestinală (prin biotransformarea lor în metaboliți de către microbiotă și influențarea acestora de către polifenoli), se poate considera că un mecanism esențial al efectului lor antiinflamator este contribuția la menținerea unei microbiote intestinale stabile și a sănătății intestinale. Aceste aspecte sunt corelate cu îmbunătățirea funcției de barieră intestinală și cu reducerea translocării componentelor bacteriene și a stimulilor prooxidativi în circulație.

GENERAL CONCLUSIONS

- 1) At 180 days of age, Pietrain pigs had the wall of the jejunum and ileum two thicker than that of the duodenum due to lymphoepithelial agglomerations in the mucosa and lymphoid follicles in the submucosa.
- 2) In the first half of the jejunum, the plicae circularis are more bulky and higher in height, and then decrease in the first portion of the ileum and disappear completely at the distal end of the ileum.
- 3) The height of the villi follows a descending curve from the duodenum to the ileum.
- 4) The depth of the intestinal crypts is less in the last third of the ileum and greater in the anterior third of the ileum, jejunum and duodenum.
- 5) Enterocytes show a life cycle that starts at the base of the intestinal crypts, matures and increases in height as it moves towards the apex of the villi, and then detaches from the epithelium.
- 6) The volume of goblet cells increases both in the Lieberkühn's glands and in the epithelium at the surface of the villi starting from the small intestine and progressing to the colon.
- 7) Bruke's muscle is highly developed and is present up to the apex of the intestinal villi.
- 8) Correlations between small intestine morphoarchitecture and neuro-endocrine-immune functions increase productive efficiency in Pietrain pigs.
- 9) Following the introduction of black grape tescovine in pigs, the highest duodenal villous height was recorded in LE3 (1%) and the lowest in LM. Among the experimental plots, the lowest villous height was at LE1 (0.1%).
- 10) The value of the depth of the crypts in the duodenum following the introduction of black grape tescovine was increasing throughout the experimental plots, with the highest value recorded for LE3 (1%). The closest value to that of LM was for LE1.
- 11) The highest value recorded for the ratio of villous height to crypt depth in the duodenum was in LE3 (1%), and the lowest ratio was in LE1 among the experimental groups.
- 12) The highest height of villi in the jejunum and ileum was in LE3 (1%), also the depth of intestinal crypts and the ratio between the two.

- 13) In jejunum and ileum, the lowest values recorded for the morphometric indices (height of villi, depth of crypts, ratio between them) were at LE1 (0.1%).
- 14) The largest lymph nodes in the submucosa of jejunum and ileum were measured in submucosa LE3.
- 15) In LE3, the cecum had the best mucosal morphoarchitecture (long intestinal glands and numerous mucus-secreting cells) and the most numerous lymph nodes in the submucosa.
- 16) Black grape tescovine, rich in polyphenols suppresses the expression of the pro-inflammatory markers Il-1 β , TNF- α and MCH-II in the small intestine and cecum of pigs.
- 17) The IHC expression for Il-1 β was strongest in LE1 and LE2 in the duodenum; in LE1, LE2 and LE4 in the jejunum and in LE1 in the cecum.
- 18) The weakest IHC staining for Il-1 β was at LE3 and LE4 in ileum and at LE3 in cecum.
- 19) IHC expression for TNF- α was strongest in LM in all analyzed sections of the digestive tract (duodenum, jejunum, ileum and cecum)
- 20) The weakest IHC expression for TNF- α was at LE3 and LE4 in duodenum and at LE3 in jejunum, ileum and cecum.
- 21) IHC expression for MCH-II was strongest in LE1 in jejunum, ileum and cecum; and weakest in LE3 and LE4 in duodenum and only in LE3 in jejunum and cecum.
- 22) Black grape tescovine positively regulated the redox balance between p65 and Nrf2, supporting the antioxidant potency of polyphenols.
- 23) IHC expression for Nrf2 was strongest in LE3 in all intestinal portions examined (duodenum, jejunum, ileum and cecum).
- 24) The weakest IHC expression for Nrf2 was at LE1 in duodenum, jejunum and cecum.
- 25) IHC expression for p65 was strongest at LE1 in jejunum and cecum.
- 26) IHC expression for p65 was weakest in LE3 and LE4 in duodenum and cecum, and only in LE3 in jejunum.
- 27) Pigs fed 1g/kg black grape coprotein for 3 months had the lowest values for final weight, ADFI and ADG; and the highest feed conversion ratio.
- 28) Pigs fed 10g/kg grape tescovin for 3 months had the highest values for initial weight, ADFI and ADG. Also LE3 had the lowest (good) feed conversion ratio.
- 29) For an economical advantage in pig production but also to ensure intestinal health, it is recommended that 10g/kg of black grape tescovin should be fed to finishing pigs for 3 months.

30) The data resulting from this study make a clear and encouraging point for the introduction of grape by-products, and in particular tescovine, into the diet of pigs to model the intestinal morphostructure and immune response, but also with a beneficial effect on production parameters.

A growing body of evidence from studies in pigs suggests that plant polyphenols may help to reduce both local and systemic inflammatory status, which is particularly relevant during the terminal phase in monogastric animals, thereby improving animal performance. Inflammation reduces feed intake, increases energy requirements for fever production and induces several hormonal changes that shift the metabolism of farm animals to a more catabolic state, which is the main reason for improvements in animal performance, such as increased gain-to-feed ratio in response to plant polyphenols. It can be suggested that a main mechanism behind the anti-inflammatory effect of polyphenols is their role in contributing to a stable gut microbiota and gut health, both of which are associated with improved gut barrier function and reduced translocation of bacterial components and pro-oxidative stimuli into the circulation, given the generally poor absorption of polyphenols from the gut and the mutual interaction between polyphenols and the gut microbiota (biotransformation of polyphenols to metabolites by the microbiota and modulation of the microbiota by polyphenols).

BIBLIOGRAFIE

1. Afsana, K., Shiga, K., Ishizuka, S., Hara, H., 2004 - *Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 68, 584–592.
2. Ahmed, S., Hossain, M., Kim, G., Hwang, J., Ji, H., Yang, C., 2013 - *Effects of resveratrol and essential oils on growth performance, immunity, digestibility and fecal microbial shedding in challenged piglets*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 26, 683.
3. Akiyama, H., Sato, Y., Watanabe, T., Nagaoka, M.H., Yoshioka, Y., Shoji, T., Kanda, T., Yamada, K., Totsuka, M., Teshima, R., 2005 - *Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models*. FEBS letters 579, 4485–4491.
4. Al-Dobaib, S., Mousa, H., 2009 - *Benefits and risks of growth promoters in animal production*. J Food Agric Environ 7, 202–8.
5. Ali, K., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2010 - *Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products*. Phytochemistry Reviews 9, 357–378.
6. Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B., García, A., 2002 - *Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 5832–5836.
7. Altmann, B., Neumann, C., Velten, S., Liebert, F., Mörlin, 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>
8. Andreasen, M.F., Kroon, P.A., Williamson, G., Garcia-Conesa, M.-T., 2001 - *Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 5679–5684.
9. Anhê, F.F., Roy, D., Pilon, G., Dudonné, S., Matamoros, S., Varin, T.V., Garofalo, C., Moine, Q., Desjardins, Y., Levy, E., 2015 - *A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice*. Gut 64, 872–883.
10. Anton, P.A., Shanahan, F., 1998 - *Neuroimmunomodulation in Inflammatory Bowel Disease: How Far from “Bench” to “Bedside”?*. Annals of the New York Academy of Sciences 840, 723–734.
11. Arnhold, J., Flemmig, J., 2010 - *Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity*. Archives of biochemistry and biophysics 500, 92–106.
12. Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008 - *Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity*. Molecular nutrition & food research 52, 79–104.
13. Auger, C., Gérain, P., Laurent-Bichon, F., Portet, K., Bornet, A., Caporiccio, B., Cros, G., Teissédre, P.-L., Rouanet, J.-M., 2004 - *Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect*. Journal of agricultural and food chemistry 52, 5297–5302.
14. Axling, U., Olsson, C., Xu, J., Fernandez, C., Larsson, S., Ström, K., Ahrné, S., Holm, C., Molin, G., Berger, K., 2012 - *Green tea powder and Lactobacillus plantarum affect gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice*. Nutrition & metabolism 9, 1–18.
15. Bacha, W.J., Bacha, L.M., 2003 - *Atlas colorido de histologia veterinária*. Roca.
16. Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., Pruess, H.G., 2000 - *Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention*. Toxicology 148, 187–197.
17. Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., Buchbauer, G., 2008 - *Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity*. Food chemistry 108, 1122–1132.
18. Bailey, M., 2009 - *The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig*. Developmental & Comparative Immunology 33, 375–383.
19. Bailey, M., Hall, L., Bland, P., Stokes, C., 1994 - *Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs*. Immunology 82, 577.
20. Bal, H., Ghoshal, N., Magilton, J., 1972 - *Histomorphology of the Torus pyloricus of the Domestic Pig (Sus scrofa domestica)*. Anatomia, Histologia, Embryologia 1, 289–298.

21. Baldwin Jr, A.S., 1996 - *The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights*. Annual review of immunology 14, 649–681.
22. Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998 - *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature 392, 245–252.
23. Banks, W.J., 1993 - *Applied veterinary histology*.
24. Baranowski, E.S., Nagel, C.W., 1983 - *Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model systems*. Journal of Food Science 48, 419–421.
25. Barnes, P.J., Karin, M., 1997- *Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. New England journal of medicine 336, 1066–1071.
26. Bartoš, P., Dolan, A., Smutný, L., Šístková, M., Celjak, I., Šoch, M., Havelka, Z., 2016 - *Effects of phytogetic feed additives on growth performance and on ammonia and greenhouse gases emissions in growing-finishing pigs*. Animal Feed Science and Technology 212, 143–148.
27. Baud, V., Karin, M., 2001 - *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends in cell biology 11, 372–377.
28. Beg, A.A., Baltimore, D., 1996 - *An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death*. Science 274, 782–784.
29. Bennell, M., Husband, A., 1981 - *Route of lymphocyte migration in pigs. I. Lymphocyte circulation in gut-associated lymphoid tissue*. Immunology 42, 469.
30. Ben-Neriah, Y., Schmidt-Supprian, M., 2007 - *Epithelial NF- κ B maintains host gut microflora homeostasis*. Nature Immunology 8, 479–481.
31. Beres, C., Costa, G.N., Cabezudo, I., da Silva-James, N.K., Teles, A.S., Cruz, A.P., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, L.M., Freitas, S.P., 2017 - *Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review*. Waste management 68, 581–594.
32. Beșcea Chiriac S.I., Solcan Gh., 2024, Toxicologie clinică veterinară, Editura Ion Ionescu de la Brad, Iași
33. Bevins, C., 2006 - *Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity*. Biochemical Society Transactions 34, 263–266.
34. Biesalski, H.K., 2007 - *Polyphenols and inflammation: basic interactions*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 10, 724–728.
35. Bimczok, D., Sowa, E.N., Faber-Zuschratter, H., Pabst, R., Rothkötter, H., 2005 - *Site-specific expression of CD11b and SIRP α (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system*. European journal of immunology 35, 1418–1427.
36. Binns, R., 1982 - *Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig*. Veterinary immunology and immunopathology 3, 95–146.
37. Binns, R., Licence, S., 1985 - *Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig*, in: *Microenvironments in the Lymphoid System*. Springer, pp. 661–668.
38. Binns, R., Pabst, R., 1988 - *Lymphoid cell migration and homing in the young pig: alternative immune mechanisms in action*. Migration and homing of lymphoid cells 2, 137–174.
39. Bischoff, S.C., 2009 - *Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells*. Semin Immunopathol 31, 185–205. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0165-4>
40. Blikslager, A.T., Moeser, A.J., Gookin, J.L., Jones, S.L., Odle, J., 2007 - *Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa*. Physiological reviews 87, 545–564.
41. Bobek, P., Ozdín, L., Hromadova, M., 1998 - *The effect of dried tomato, grape and apple pomace on the cholesterol metabolism and antioxidative enzymatic system in rats with hypercholesterolemia*. Food/Nahrung 42, 317–320.
42. Bockman, D.E., Cooper, M.D., 1973 - *Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study*. American journal of Anatomy 136, 455–477.
43. Bogs, J., Downey, M.O., Harvey, J.S., Ashton, A.R., Tanner, G.J., Robinson, S.P., 2005 - *Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves*. Plant physiology 139, 652–663.
44. 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.
45. Bondar, A.; Horodincu, L.; Solcan, G.; Solcan, C. Use of Spirulina platensis and Curcuma longa as Nutraceuticals in Poultry. *Agriculture* 2023, 13, 8, 1553.
46. Bono, C.D., Elwell, M.R., Rogers, K., 2000 - *Necropsy techniques with standard collection and trimming of tissues*, in: *The Laboratory Rat*. Elsevier, pp. 569–600.

47. Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., Eberl, G., 2008 - *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. *Nature* 456, 507–510.
48. Brandtzaeg, P., 2010 - *Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation*. *Immunological investigations* 39, 303–355.
49. Bravo, L., 1998 - *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. *Nutrition reviews* 56, 317–333.
50. Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., Arija, I., 2016 - *Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review*. *Animal Feed Science and Technology* 211, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
51. Broer, S., 2008 - *Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia*. *Physiological reviews* 88, 249–286.
52. Broom, L.J., Kogut, M.H., 2018 - *Gut immunity: its development and reasons and opportunities for modulation in monogastric production animals*. *Animal health research reviews* 19, 46–52.
53. Brown, D., Maxwell, C., Erf, G., Davis, M., Singh, S., Johnson, Z., 2006 - *Ontogeny of T lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period*. *Journal of animal science* 84, 567–578.
54. Bunzel, M., Ralph, J., Lu, F., Hatfield, R.D., Steinhart, H., 2004 - *Lignins and ferulate– coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains*. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 6496–6502.
55. Burmester, G.-R., Pezzutto, A., Ulrichs, T., Aicher, A., 2003 - *Color atlas of immunology*. Thieme New York.
56. Burzynska-Pedziwiatr, I., Bukowiecka-Matusiak, M., Wojcik, M., Machala, W., Bienkiewicz, M., Spolnik, G., Danikiewicz, W., Wozniak, L.A., 2014 - *Dual Stimulus-Dependent Effect of Oenothera paradoxa Extract on the Respiratory Burst in Human Leukocytes: Suppressing for Escherichia coli and Phorbol Myristate Acetate and Stimulating for Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, 764367.
57. Butler, J., Zhao, Y., Sinkora, M., Wertz, N., Kacskovics, I., 2009 - *Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development*. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 321–333.
58. Calland, N., Albecka, A., Belouzard, S., Wychowski, C., Duverlie, G., Descamps, V., Hober, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2012 - *(-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry*. *Hepatology* 55, 720–729.
59. Calland, N., Sahuc, M.-E., Belouzard, S., Pène, V., Bonnafeous, P., Mesalam, A.A., Deloison, G., Descamps, V., Sahpaz, S., Wychowski, C., 2015 - *Polyphenols inhibit hepatitis C virus entry by a new mechanism of action*. *Journal of virology* 89, 10053–10063.
60. Camilleri, J.M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B., Verne, G., 2012 - *Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease*. *Neurogastroenterology & Motility* 24, 503–512.
61. Campbell, D.J., Butcher, E.C., 2002 - *Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues*. *The Journal of experimental medicine* 195, 135–141.
62. Cantos, E., Espin, J.C., Tomás-Barberán, F.A., 2002 - *Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC– DAD– MS– MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5691–5696.
63. Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A., 2014 - *Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 155–171.
64. Caspary, W.F., 1987 - *Structure and Function of the Small Intestine: Delaying of Absorption as a Therapeutic Principle: Treatment of Diabetes Mellitus*. *Excerpta Medica*.
65. Cavey, M., Lecuit, T., 2009 - *Molecular bases of cell–cell junctions stability and dynamics*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002998.
66. Cera, K., Mahan, D., Cross, R., Reinhart, G., Whitmoyer, R., 1988 - *Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine*. *Journal of animal science* 66, 574–584.
67. Cermak, R., Landgraf, S., Wolffram, S., 2004 - *Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum*. *British Journal of Nutrition* 91, 849–855.
68. Cermak, R., Landgraf, S., Wolffram, S., 2003 - *The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors*. *The Journal of nutrition* 133, 2802–2807.
69. Chamorro, C., De Paz, P., Fernández, J., Anel, L., 1993 - *Fungiform papillae of the pig and the wild boar analyzed by scanning electron microscopy*. *Scanning microscopy* 7, 34.

70. Chang, H.Y., Yang, X., 2000 - *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiology and molecular biology reviews 64, 821–846.
71. Charerntantanakul, W., Roth, J.A., 2006 - *Biology of porcine T lymphocytes*. Anim. Health. Res. Rev. 7, 81–96. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001235>
72. Chedea, V.S., Drăgulescu, A.-M., Tomoiagă, L.L., Bălăceanu, C., Iliescu, M.L., 2021 - *Climate change and internet of things technologies—Sustainable premises of extending the culture of the amurg cultivar in Transylvania—A use case for Târnavă Vineyard*. Sustainability 13, 8170.
73. Chedea, V.S., Palade, L.M., Marin, D.E., Pelmus, R.S., Habeanu, M., Rotar, M.C., Gras, M.A., Pistol, G.C., Taranu, I., 2018 - *Intestinal absorption and antioxidant activity of grape pomace polyphenols*. Nutrients 10, 588.
74. Chen, K., You, J., Tang, Y., Zhou, Y., Liu, P., Zou, D., Zhou, Q., Zhang, T., Zhu, J., Mi, M., 2014 - *Supplementation of superfine powder prepared from Chaenomeles speciosa fruit increases endurance capacity in rats via antioxidant and Nrf2/ARE signaling pathway*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014, 976438.
75. Chen, X.-L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M.A., Rovin, B.H., Kunsch, C., 2006 - *Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 290, H1862–H1870.
76. Cheng, Y., Song, M., Zhu, Q., Azad, Md.A.K., Gao, Q., Kong, X., 2021 - *Dietary Betaine Addition Alters Carcass Traits, Meat Quality, and Nitrogen Metabolism of Bama Mini-Pigs*. Front. Nutr. 8, 728477. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.728477>
77. Cheng, Y.-T., Wu, C.-H., Ho, C.-Y., Yen, G.-C., 2013 - *Catechin protects against ketoprofen-induced oxidative damage of the gastric mucosa by up-regulating Nrf2 in vitro and in vivo*. The Journal of nutritional biochemistry 24, 475–483.
78. Cheynier, V.F., Trousdale, E.K., Singleton, V.L., Salgues, M.J., Wylde, R., 1986 - *Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 34, 217–221.
79. China, R., Mukherjee, S., Sen, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., Ghosh, S., Dhar, P., 2012 - *Antimicrobial activity of Sesbania grandiflora flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism Lactobacillus acidophilus*. Microbiological research 167, 500–506.
80. Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., Clark, J.R., 2004 - *Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 1771–1782.
81. Cho, S.-J., Jung, U.J., Park, H.-J., Kim, H.-J., Park, Y.B., Kim, S.R., Choi, M.-S., 2013 - *Combined ethanol extract of grape pomace and omija fruit ameliorates adipogenesis, hepatic steatosis, and inflammation in diet-induced obese mice*. Evidence-based complementary and Alternative Medicine 2013.
82. Chow, J., Lee, S.M., Shen, Y., Khosravi, A., Mazmanian, S.K., 2010 - *Host–bacterial symbiosis in health and disease*. Advances in immunology 107, 243–274.
83. Choy, Y.Y., Quifer-Rada, P., Holstege, D.M., Frese, S.A., Calvert, C.C., Mills, D.A., Lamuela-Raventos, R.M., Waterhouse, A.L., 2014 - *Phenolic metabolites and substantial microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins*. Food & function 5, 2298–2308.
84. Chu, R., Liu, C., 1984 - *Morphological and functional comparisons of Peyer's patches in different parts of the swine small intestine*. Veterinary immunology and immunopathology 6, 391–403.
85. Chu, R.M., Glock, R., Ross, R., 1979 - *Gut-associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine*.
86. Chuang, C.-C., Bumrungpert, A., Kennedy, A., Overman, A., West, T., Dawson, B., McIntosh, M.K., 2011 - *Grape powder extract attenuates tumor necrosis factor α -mediated inflammation and insulin resistance in primary cultures of human adipocytes*. The Journal of nutritional biochemistry 22, 89–94.
87. Ciesek, S., von Hahn, T., Colpitts, C.C., Schang, L.M., Friesland, M., Steinmann, J., Manns, M.P., Ott, M., Wedemeyer, H., Meuleman, P., 2011 - *The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry*. Hepatology 54, 1947–1955.
88. Clarke, R.M., 1973 - *Progress in measuring epithelial turnover in the villus of the small intestine*. Digestion 8, 161–175.
89. Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T., 1995 - *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers*. The FASEB Journal 9, 899–909.
90. Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H., 2007 - *Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality*.

91. Constabel, P., Yoshida, K., Walker, V., 2014 - *Diverse ecological roles of plant tannins: plant defense and beyond*. Recent advances in polyphenol research 115–142.
92. Corrêa, T.A.F., Rogero, M.M., Hassimotto, N.M.A., Lajolo, F.M., 2019 - *The two-way polyphenols-microbiota interactions and their effects on obesity and related metabolic diseases*. Frontiers in nutrition 6, 188.
93. Costa, M.M., Alfaia, C.M., Lopes, P.A., Pestana, J.M., Prates, J.A., 2022 - *Grape by-products as feedstuff for pig and poultry production*. Animals 12, 2239.
94. Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., Mendoza, L., 2014 - *In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (Vitis vinifera) pomace*. Molecules 19, 21154–21167.
95. Courraud, J., Charnay, C., Cristol, J.-P., Berger, J., Avallone, S., 2013 - *In vitro lipid peroxidation of intestinal bile salt-based nanoemulsions: Potential role of antioxidants*. Free Radical Research 47, 1076–1087.
96. Creasy, L., Swain, T., 1965 - *Structure of condensed tannins*. Nature 208, 151–153.
97. Crozier, A., 2003 - *Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview*. Plants: diet and health. The report of a British Nutrition Foundation Task Force 27–48.
98. Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009 - *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. Natural product reports 26, 1001–1043.
99. Cuadrado, A., Martín-Moldes, Z., Ye, J., Lastres-Becker, I., 2014 - *Transcription factors NRF2 and NF- κ B are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation*. Journal of Biological Chemistry 289, 15244–15258.
100. Cui, Y., Yang, X., Lu, X., Chen, J., Zhao, Y., 2014 - *Protective effects of polyphenols-enriched extract from Huangshan Maofeng green tea against CCl₄-induced liver injury in mice*. Chemico-biological interactions 220, 75–83.
101. Cullen, J., Lawlor, P.G., Gardiner, G.E., 2022 - *Microbiological services delivered by the pig gut microbiome*.
102. Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H., Porter, L.J., 1980 - *Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 2278–2286.
103. Dai, J., Mumper, R.J., 2010 - *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules 15, 7313–7352.
104. Date, A.A., Destache, C.J., 2016 - *Natural polyphenols: potential in the prevention of sexually transmitted viral infections*. Drug Discovery Today 21, 333–341.
105. De Jonge, W.J., van der Zanden, E.P., van den Wijngaard, R.M., Boeckxstaens, G.E., 2005 - *Inflammation and gut motility; neural control of intestinal immune cell activation*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 41, S10–S11.
106. de la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á., Obreque-Slier, E., 2015 - *Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (Vitis vinifera L.)*. Journal of the Science of Food and Agriculture 95, 1521–1527.
107. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013 - *Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. Antioxidants & redox signaling 18, 1818–1892.
108. Delgado, M., Ganea, D., 2000 - *VIP and PACAP inhibit activation induced apoptosis in T lymphocytes*. Annals of the New York Academy of Sciences 921, 55–67.
109. Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., Blazheva, D., Toshkova, R., Gardeva, E., Yossifova, L., 2014 - *Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health*. Food Chemistry 157, 37–44.
110. Derochette, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., Neven, P., Serteyn, D., 2013 - *Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells*. Chemico-biological interactions 201, 49–57.
111. Devi, S.M., Park, J.W., Kim, I.H., 2015 - *Effect of plant extracts on growth performance and insulin-like growth factor 1 secretion in growing pigs*. Revista Brasileira de Zootecnia 44, 355–360.
112. Diaz del Consuelo, I., Pizzolato, G.-P., Falson, F., Guy, R.H., Jacques, Y., 2005 - *Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue*. Journal of Pharmaceutical Sciences 94, 2777–2788. <https://doi.org/10.1002/jps.20409>
113. Dikeman, M., 2007 - *Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality*. Meat science 77, 121–135.
114. Dixon, R.A., Xie, D., Sharma, S.B., 2005 - *Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?* New phytologist 165, 9–28.

115. Dukes, C., Bussey, H., 1926 - *The number of lymphoid follicles of the human large intestine*. J Pathol Bacteriol 29, 111–6.
116. Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A.A., Novellino, E., Santini, A., 2019 - *Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health*. Phytotherapy Research 33, 2221–2243.
117. Dzik, S., 2000 - *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Transfusion Medicine Reviews 1, 88–89.
118. Eder, K., Flader, D., Hirche, F., Brandsch, C., 2002 - *Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil*. The Journal of nutrition 132, 3400–3404.
119. Edwin, H., 1980 - *In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines*. Phytochemistry 19, 2577–2582.
120. Erinle, T.J., Adewole, D.I., 2022 - *Fruit pomaces—Their nutrient and bioactive components, effects on growth and health of poultry species, and possible optimization techniques*. Animal nutrition 9, 357–377.
121. Eriz, G., Sanhueza, V., Roeckel, M., Fernández, K., 2011 - *Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from Vitis vinifera L. cv. País*. LWT-Food science and technology 44, 860–865.
122. Etxeberría, U., Arias, N., Boqué, N., Macarulla, M., Portillo, M., Martínez, J., Milagro, F., 2015 - *Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats*. The Journal of nutritional biochemistry 26, 651–660.
123. Eurell, J.A., Frappier, B.L., 2013 - *Dellmann's textbook of veterinary histology*. John Wiley & Sons.
124. Fang, L., Li, M., Zhao, L., Han, S., Li, Y., Xiong, B., Jiang, L., 2020 - *Dietary grape seed procyanidins suppressed weaning stress by improving antioxidant enzyme activity and mRNA expression in weanling piglets*. Journal of animal physiology and animal nutrition 104, 1178–1185.
125. Faria, A., Fernandes, I., Norberto, S., Mateus, N., Calhau, C., 2014 - *Interplay between anthocyanins and gut microbiota*. Journal of agricultural and food chemistry 62, 6898–6902.
126. Farmer, C., Giguère, A., Lessard, M., 2010 - *Dietary supplementation with different forms of flax in late gestation and lactation: Effects on sow and litter performances, endocrinology, and immune response*. Journal of animal science 88, 225–237.
127. Felhi, S., Baccouch, N., Ben Salah, H., Smaoui, S., Allouche, N., Gharsallah, N., Kadri, A., 2016 - *Nutritional constituents, phytochemical profiles, in vitro antioxidant and antimicrobial properties, and gas chromatography–mass spectrometry analysis of various solvent extracts from grape seeds (Vitis vinifera L.)*. Food science and biotechnology 25, 1537–1544.
128. Felten, D., Felten, S., Carlson, S., Olschowka, J., Livnat, S., 1985 - *Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 135, 755s–765s.
129. Ferraris, R.P., Diamond, J., 1997 - *Regulation of intestinal sugar transport*. Physiological reviews 77, 257–302.
130. Fiesel, A., Gessner, D.K., Most, E., Eder, K., 2014 - *Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs*. BMC veterinary research 10, 1–11.
131. Fong, R.A., Kepner, R.E., Webb, A.D., 1971 - *Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of Vitis vinifera*. American Journal of Enology and Viticulture 22, 150–155.
132. Foo, L.Y., Porter, L.J., 1981 - *The structure of tannins of some edible fruits*. Journal of the Science of Food and Agriculture 32, 711–716.
133. Foo, L.Y., Porter, L.J., 1980 - *The phytochemistry of proanthocyanidin polymers*. Phytochemistry 19, 1747–1754.
134. Fossum, C., 1998 - *Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig*. Domestic animal endocrinology 15, 439–444.
135. Fothergill, L.J., Galiazzo, G., Hunne, B., Stebbing, M.J., Fakhry, J., Weissenborn, F., Fazio Coles, T.E., Furness, J.B., 2019 - *Distribution and co-expression patterns of specific cell markers of enteroendocrine cells in pig gastric epithelium*. Cell and tissue research 378, 457–469.
136. Fournier, B., Parkos, C., 2012 - *The role of neutrophils during intestinal inflammation*. Mucosal immunology 5, 354–366.
137. Fraga, C.G., 2007 - *Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions*. IUBMB life 59, 308–315.
138. Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2011 - *Dietary flavonoids: role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling*. Free Radical Biology and Medicine 51, 813–823.
139. Freudenberg, K., Blümmel, F., 1924 - *Hamameli-tannin. III. Mitteilung über Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 440, 45–59.

140. Frossi, B., Gri, G., Tripodo, C., Pucillo, C., 2010 - *Exploring a regulatory role for mast cells: 'MCregs'?* Trends in Immunology 31, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.12.007>
141. Fujihashi, K., Boyaka, P.N., McGhee, J.R., 2008 - *Host defenses at mucosal surfaces*. Clinical immunology 287–303.
142. Fukata, M., Arditi, M., 2013 - *The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation*. Mucosal immunology 6, 451–463.
143. Funda, D.P., Tučková, L., Farré, M.A., Iwase, T., Moro, I., Tlaskalová-Hogenová, H., 2001 - *CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited*. Infection and immunity 69, 3772–3781.
144. Gaffney, S., Williams, V., Flynn, P., Carlino, R., Mowry, C., Dierenfeld, E., Babb, C., Fan, J., Tramontano, W., 2004 - *Tannin/polyphenol effects on iron solubilization in vitro*. Bios 75, 43–52.
145. Gal, A.F., Matei-Lătiu, M.C., Lătiu, C., Nndrei S., Rus V., 2024, Caecal villi? A comparative histological and morphometric study of caecal and jejunal mucosa in adult rabbits. *Acta Vet Scand*, **66**, 50 (2024)
146. Garrido, M.D., Auqui, M., Martí, N., Linares, M.B., 2011 - *Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers*. LWT-Food Science and Technology 44, 2238–2243.
147. Gaucher, G., Satturwar, P., Jones, M.-C., Furtos, A., Leroux, J.-C., 2010 - *Polymeric micelles for oral drug delivery*. European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics 76, 147–158.
148. Gebert, A., Rothkötter, H.-J., Pabst, R., 1994 - *Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches*. Cell and tissue research 276, 213–221.
149. Geny, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F., Glories, Y., 2003. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 8051–8054.
150. Georgescu M., Ginghină O., Raita S. și col., 2018, Natural alternative remedies in the background of updated recommendations for the prophylactic and therapeutic approach of *Clostridium difficile* infections, *FARMACIA*, 2018, Vol. 66, 4, 563-572
151. Gessner, D., Ringseis, R., Eder, K., 2017. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 101, 605–628.
152. Gessner, D.K., Fiesel, A., Most, E., Dinges, J., Wen, G., Ringseis, R., Eder, K., 2013. Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55, 1–10.
153. Ghosh, S., Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *cell* 109, S81–S96.
154. Giribabu, N., Eswar Kumar, K., Swapna Rekha, S., Muniandy, S., Salleh, N., 2015. *Vitis vinifera* (Muscat Variety) seed ethanolic extract preserves activity levels of enzymes and histology of the liver in adult male rats with diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 542026.
155. Godevac, D., Tešević, V., Veličković, M., Vujisić, L., Vajs, V., Milosavljević, S., 2010. Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society* 75, 1641–1652.
156. Goodrich, K.M., Fundaro, G., Griffin, L.E., Hulver, M.W., Ponder, M.A., Neilson, A.P., 2012. Chronic administration of dietary grape seed extract increases colonic expression of gut tight junction protein occludin and reduces fecal calprotectin: a secondary analysis of healthy Wistar Furth rats. *Nutrition research* 32, 787–794.
157. Goto, Y., Ivanov, I.I., 2013. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal–host immune crosstalk. *Immunology and cell biology* 91, 204–214.
158. Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karaterolioti, H., Georgadakis, S., Kerasioti, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., Statiri, A., 2014. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human & experimental toxicology* 33, 1099–1112.
159. Grosu, I.A., Pistol, G.C., Taranu, I., Marin, D.E., 2019. The impact of dietary grape seed meal on healthy and aflatoxin B1 afflicted microbiota of pigs after weaning. *Toxins* 11, 25.
160. Gungor, E., Altop, A., Erener, G., 2021. Effect of raw and fermented grape seed on growth performance, antioxidant capacity, and cecal microflora in broiler chickens. *Animal* 15, 100194.
161. Guo, W., Kong, E., Meydani, M., 2009. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutrition and cancer* 61, 807–810.
162. Gupta, S.C., Tyagi, A.K., Deshmukh-Taskar, P., Hinojosa, M., Prasad, S., Aggarwal, B.B., 2014. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics* 559, 91–99.
163. Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., Baldwin Jr, A.S., 1999. NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and cellular biology*.

164. Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M., 2000. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free radical research* 33, 819–830.
165. Hampson, D., 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in veterinary science* 40, 32–40.
166. Hampson, D., Kidder, D., 1986. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Research in veterinary science* 40, 24–31.
167. Han, M., Song, P., Huang, C., Rezaei, A., Farrar, S., Brown, M.A., Ma, X., 2016. Dietary grape seed proanthocyanidins (GSPs) improve weaned intestinal microbiota and mucosal barrier using a piglet model. *Oncotarget* 7, 80313.
168. Hanlin, R.L., Kelm, M.A., Wilkinson, K.L., Downey, M.O., 2011. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 13265–13276.
169. Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H.I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z., 2014. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in microbiology* 5, 288.
170. Hao, R., Li, Q., Zhao, J., Li, H., Wang, W., Gao, J., 2015. Effects of grape seed procyanidins on growth performance, immune function and antioxidant capacity in weaned piglets. *Livestock Science* 178, 237–242.
171. Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
172. Harman, A.N., Kim, M., Nasr, N., Sandgren, K.J., Cameron, P.U., 2013. Tissue dendritic cells as portals for HIV entry. *Reviews in Medical Virology* 23, 319–333. <https://doi.org/10.1002/rmv.1753>
173. Hartsock, A., Nelson, W.J., 2008. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778, 660–669.
174. Hashemi, S. R., & Davoodi, H., 2011. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary research communications*, 35, 169–180.
175. Haverson, K., Singha, S., Stokes, C., Bailey, M., 2000. Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology* 101, 492–500.
176. Hayden, M., West, A., Ghosh, S., 2006. NF- κ B and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780.
177. He, F., Mu, L., Yan, G.-L., Liang, N.-N., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q., 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15, 9057–9091.
178. Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS medicine* 5, e54.
179. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 13, 572–584.
180. Henchion, M., Moloney, A.P., Hyland, J., Zimmermann, J., McCarthy, S., 2021. Review: Trends for meat, milk and egg consumption for the next decades and the role played by livestock systems in the global production of proteins. *Animal* 15, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100287>
181. Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., Lauvergeat, V., 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of experimental botany* 62, 2465–2483.
182. Hillery, A.M., Lloyd, A.W., Swarbrick, J., 2003. Drug delivery and targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists. Crc press.
183. Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., Strauss, M., 1999. NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and cellular biology*.
184. Ho, G.T.T., Wangenstein, H., Barsett, H., 2017. Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells. *International journal of molecular sciences* 18, 584.
185. Holman, D.B., Brunelle, B.W., Trachsel, J., Allen, H.K., 2017. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems* 2, e00004-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00004-17>
186. Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., Leube, R.E., 2007. Structure and function of desmosomes. *International review of cytology* 264, 65–163.
187. Horodincu, L.; Solcan, C. Influence of Different Light Spectra on Melatonin Synthesis by the Pineal Gland and Influence on the Immune System in Chickens. *Animals* 2023, 13, 2095.
188. Hou, D.-X., Masuzaki, S., Hashimoto, F., Uto, T., Tanigawa, S., Fujii, M., Sakata, Y., 2007. Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-activated mouse macrophages: Molecular mechanisms and structure–activity relationship. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 460, 67–74.

189. Hou, X., Zhang, J., Ahmad, H., Zhang, H., Xu, Z., Wang, T., 2014. Evaluation of antioxidant activities of ampelopsin and its protective effect in lipopolysaccharide-induced oxidative stress piglets. *PloS one* 9, e108314.
190. Hrazdina, G., 1992. Biosynthesis of flavonoids, in: *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. Springer, pp. 61–72.
191. Hsu, S., 2015. Compounds derived from epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a novel approach to the prevention of viral infections. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)* 14, 13–18.
192. Huang, R.-Y., Yu, Y.-L., Cheng, W.-C., OuYang, C.-N., Fu, E., Chu, C.-L., 2010. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *The Journal of Immunology* 184, 6815–6821.
193. Hur, S.J., Kang, S.H., Jung, H.S., Kim, S.C., Jeon, H.S., Kim, I.H., Lee, J.D., 2012. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutrition research* 32, 801–816.
194. Huygelen, V., De Vos, M., Willemen, S., Fransen, E., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., Van Ginneken, C., 2014. Age-related differences in mucosal barrier function and morphology of the small intestine in low and normal birth weight piglets. *Journal of Animal Science* 92, 3398–3406. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7742>
195. Igartuburu, J.M., Pando, E., Rodríguez-Luis, F., Gil-Serrano, A., 1998. Structure of a Hemicellulose A Fraction in Dietary Fiber from the Seed of Grape Variety Palomino (*Vitis vinifera* cv. Palomino). *Journal of natural products* 61, 876–880.
196. Inman, C.F., Singha, S., Lewis, M., Bradley, B., Stokes, C., Bailey, M., 2010. Dendritic cells interact with CD4 T cells in intestinal mucosa. *Journal of leukocyte biology* 88, 571–578.
197. Inoue, H., Maeda-Yamamoto, M., Nesumi, A., Tanaka, T., Murakami, A., 2013. Low and medium but not high doses of green tea polyphenols ameliorated dextran sodium sulfate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, 1223–1228.
198. Inoue, T., Sugi, Y., 1978. On gut associated lymphoid tissues of piglets.
199. Iuga, M., Mironeasa, S., 2020. Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, 2473–2505.
200. Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., Song, S.-Y., 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21, 527–538.
201. Janz, J., Morel, P., Wilkinson, B., Purchas, R., 2007. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science* 75, 350–355.
202. Jialal, I., Kaur, H., 2012. The role of toll-like receptors in diabetes-induced inflammation: implications for vascular complications. *Current diabetes reports* 12, 172–179.
203. Jin, Q., O’Hair, J., Stewart, A.C., O’Keefe, S.F., Neilson, A.P., Kim, Y.-T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G., Huang, H., 2019. Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. *Foods* 8, 667.
204. Johannsen, H., Prescott, S., 2009. Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they? *Clinical & Experimental Allergy* 39, 1801–1814.
205. Johansson, M.E., Thomsson, K.A., Hansson, G.C., 2009. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *Journal of proteome research* 8, 3549–3557.
206. Joseph, S.V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B.M., 2016. Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. *Critical reviews in food science and nutrition* 56, 419–444.
207. Jugl-Chizzola, M., Ungerhofer, E., Gabler, C., Hagmüller, W., Chizzola, R., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C., 2006. Testing of the palatability of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. as flavouring feed additive for weaner pigs on the basis of a choice experiment. *Berliner Und Munchener Tierärztliche Wochenschrift* 119, 238–243.
208. Jung, C., Hugot, J.-P., Barreau, F., 2010. Peyer’s Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International journal of inflammation* 2010, 823710.
209. Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., Kagnoff, M., 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation* 95, 55–65.
210. Kafantaris, I., Stagos, D., Kotsampasi, B., Hatzis, A., Kypriotakis, A., Gerasopoulos, K., Makri, S., Goutzourelas, N., Mitsagga, C., Giavasis, I., 2018. Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. *Animal* 12, 246–255.
211. Kaiko, G.E., Stappenbeck, T.S., 2014. Host–microbe interactions shaping the gastrointestinal environment. *Trends in Immunology* 35, 538–548. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.08.002>

212. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A., 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 4360–4367.
213. Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 1304–1309.
214. Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11, 373–384.
215. Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S., Conway, S., 2004. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature immunology* 5, 104–112.
216. Kelly, D., King, T., McFadyen, M., Travis, A., 1991a. Effect of lactation on the decline of brush border lactase activity in neonatal pigs. *Gut* 32, 386–392.
217. Kelly, D., Smyth, J., McCracken, K., 1991b. Digestive development of the early-weaned pig: 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *British journal of Nutrition* 65, 169–180.
218. Kelsall, B.L., Strober, W., 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *The Journal of experimental medicine* 183, 237–247. <https://doi.org/10.1084/jem.183.1.237>
219. Kenworthy, R., 1976. Observations on the effects of weaning in the young pig. *Clinical and histopathological studies of intestinal function and morphology. Research in veterinary science* 21, 69–75.
220. Khanbabaee, K., Van Ree, T., 2001. Tannins: classification and definition. *Natural product reports* 18, 641–649.
221. Klein, E., 1878. Report on infectious pneumoenteritis of the pig (so called pig-ty-phoid).
222. Knoop, K.A., Newberry, R.D., 2012. Isolated lymphoid follicles are dynamic reservoirs for the induction of intestinal IgA. *Frontiers in immunology* 3, 84.
223. Köhne, G., Schneider, T., Zeitz, M., 1996. 3 Special features of the intestinal lymphocytic system. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 10, 427–442. [https://doi.org/10.1016/S0950-3528\(96\)90051-2](https://doi.org/10.1016/S0950-3528(96)90051-2)
224. Kommera, S., Mateo, R., Neher, F., Kim, S., 2006. Phytobiotics and organic acids as potential alternatives to the use of antibiotics in nursery pig diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19, 1784–1789.
225. Krause, D.O., House, J.D., Nyachoti, C.M., 2005. Alternatives to antibiotics in swine diets: a molecular approach. *Proc Manitoba Swine Sem* 19, 57–66.
226. Krause, W.J., 2005. Krause's essential human histology for medical students. Universal-Publishers.
227. Kumar, M., Kumar, V., Roy, D., Kushwaha, R., Vaiswani, S., 2014. Application of herbal feed additives in animal nutrition-a review. *International Journal of Livestock Research* 4, 1–8.
228. Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal* 2013.
229. Kunder, C.A., St. John, A.L., Li, G., Leong, K.W., Berwin, B., Staats, H.F., Abraham, S.N., 2009. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* 206, 2455–2467. <https://doi.org/10.1084/jem.20090805>
230. Kunzelmann, K., Mall, M., 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological reviews* 82, 245–289.
231. Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., Teissedre, P.-L., 2014. Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules* 19, 482–506.
232. Lærke, H.N., Hedemann, M.S., 2012. The digestive system of the pig, in: *Nutritional Physiology of Pigs*-Online Publication. Videncenter for Svineproduktion.
233. Lakhdari, O., Tap, J., Béguet-Crespel, F., Le Roux, K., De Wouters, T., Cultrone, A., Nepelska, M., Lefevre, F., Doré, J., Blottiere, H.M., 2011. Identification of NF- κ B modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *BioMed Research International* 2011, 282356.
234. Lallès, J.-P., Boudry, G., Favier, C., Le Floch, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I.P., Pié, S., Piel, C., Sève, B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* 53, 301–316.
235. Landete, J., 2012. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical reviews in food science and nutrition* 52, 936–948.
236. Landsverk, T., 1984. Is the ileo - caecal peyer's patch in ruminants a mammalian «bursa—equivalent»? *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series A: Pathology* 92, 77–79.
237. Landsverk, T., 1981. The Epithelium Covering Peyer's Patches in Young Milk-Fed Calves: An Ultrastructural and Enzyme Histochemical Investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22, 198–210.

238. Lau, D.W., King, A.J., 2003. Pre-and post-mortem use of grape seed extract in dark poultry meat to inhibit development of thiobarbituric acid reactive substances. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 51, 1602–1607.
239. Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, Y.K., 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in microbiology* 157, 876–884.
240. Lee, J.S., Kim, S.G., Kim, H.K., Lee, T., Jeong, Y., Lee, C., Yoon, M., Na, Y.J., Suh, D., Park, N.C., 2007. Silibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells. *Journal of cellular physiology* 210, 385–397.
241. Levy, L.F., Posternack, T., Robinson, R., 1931. CCCLXXIV.—Experiments on the synthesis of the anthocyanins. Part VIII. A synthesis of œnin chloride. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 2701–2715.
242. Lewis, M.C., Inman, C.F., Patel, D., Schmidt, B., Mulder, I., Miller, B., Gill, B.P., Pluske, J., Kelly, D., Stokes, C.R., 2012. Direct experimental evidence that early-life farm environment influences regulation of immune responses. *Pediatric Allergy and Immunology* 23, 265–269.
243. Li, J., Sung, C.Y.J., Lee, N., Ni, Y., Pihlajamäki, J., Panagiotou, G., El-Nezami, H., 2016. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518189113>
244. Li, M., Hagerman, A.E., 2013. Interactions between plasma proteins and naturally occurring polyphenols. *Current drug metabolism* 14, 432–445.
245. Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature reviews immunology* 2, 725–734.
246. Li, W.-G., Zhang, X.-Y., Wu, Y., Tian, X., 2001. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacologica Sinica* 22, 1117–1120.
247. Li, Y., Rahman, S.U., Huang, Y., Zhang, Y., Ming, P., Zhu, L., Chu, X., Li, J., Feng, S., Wang, X., 2020. Green tea polyphenols decrease weight gain, ameliorate alteration of gut microbiota, and mitigate intestinal inflammation in canines with high-fat-diet-induced obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 78, 108324.
248. Liebig, H.-G., 2010. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer Verlag.
249. Lieber, E.M., Lemke, C., Pohlenz, J.F., 1995. Ultrastructural study of the uptake of ferritin by M cells in the follicle-associated epithelium in the small and large intestines of pigs. *American journal of veterinary research* 56, 725–730.
250. Lim, C.-G., AG Koffas, M., 2010. Bioavailability and recent advances in the bioactivity of flavonoid and stilbene compounds. *Current Organic Chemistry* 14, 1727–1751.
251. Lin, L.-Z., Sun, J., Chen, P., Monagas, M.J., Hamly, J.M., 2014. UHPLC-PDA-ESI/HRMS n profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 9387–9400.
252. Lin, M.-K., Yu, Y.-L., Chen, K.-C., Chang, W.-T., Lee, M.-S., Yang, M.-J., Cheng, H.-C., Liu, C.-H., Chen, D.-C., Chu, C.-L., 2011. Kaempferol from *Semen cuscutae* attenuates the immune function of dendritic cells. *Immunobiology* 216, 1103–1109.
253. Liu, GM, Wei, Y., Wang, Z., Wu, D., Zhou, A., Liu, GL, 2008. Effects of herbal extract supplementation on growth performance and insulin-like growth factor (IGF)-I system in finishing pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17, 538–547.
254. Liu, S.-H., Lin, C.-H., Hung, S.-K., Chou, J.-H., Chi, C.-W., Fu, S.-L., 2010. Fisetin inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation and dendritic cell maturation. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 10831–10839.
255. Lowden, S., Heath, T., 1994. Ileal Peyer's patches in pigs: intercellular and lymphatic pathways. *The Anatomical Record* 239, 297–305.
256. Lu, Y., Foo, L.Y., 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food chemistry* 65, 1–8.
257. Luca, S.V., Kulinowski, Ł., Ciobanu, C., Zengin, G., Czerwińska, M.E., 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.
258. Luceri, C., Caderni, G., Sanna, A., Dolara, P., 2002. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *The Journal of nutrition* 132, 1376–1379.
259. Luehring, M., Blank, R., Wolfram, S., 2011. Vitamin E-sparing and vitamin E-independent antioxidative effects of the flavonol quercetin in growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 169, 199–207.

260. Ma, Q., 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 401–426.
261. Macpherson, A.J., Uhr, T., 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662–1665.
262. Madsen, H.L., Bertelsen, G., Skibsted, L.H., 1997. Antioxidative activity of spices and spice extracts. ACS Publications.
263. Mahfuz, S., Shang, Q., Piao, X., 2021. Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12, 1–18.
264. Maiuri, M.C., De Stefano, D., Di Meglio, P., Irace, C., Savarese, M., Sacchi, R., Cinelli, M.P., Carnuccio, R., 2005. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 371, 457–465.
265. Makala, L., Suzuki, N., Nagasawa, H., 2002. Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine. *Pathobiology* 70, 55–68.
266. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727–747.
267. Martinez-Micaelo, N., González-Abuín, N., Ardevol, A., Pinent, M., Blay, M.T., 2012. Procyanidins and inflammation: Molecular targets and health implications. *Biofactors* 38, 257–265.
268. Massot-Cladera, M., Abril-Gil, M., Torres, S., Franch, A., Castell, M., Pérez-Cano, F.J., 2014. Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *British journal of nutrition* 112, 1944–1954.
269. Matameh, S.K., Silva, S.L., Gerrard, D.E., 2021. New Insights in Muscle Biology that Alter Meat Quality. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 9, 355–377. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083902>
270. Mayer, R., Stecher, G., Wuerzner, R., Silva, R.C., Sultana, T., Trojer, L., Feuerstein, I., Krieg, C., Abel, G., Popp, M., 2008. Proanthocyanidins: target compounds as antibacterial agents. *Journal of agricultural and food Chemistry* 56, 6959–6966.
271. Mbimba, T., Awale, P., Bhatia, D., J Geldenhuys, W., S Darvesh, A., T Carroll, R., Bishayee, A., 2012. Alteration of hepatic proinflammatory cytokines is involved in the resveratrol-mediated chemoprevention of chemically-induced hepatocarcinogenesis. *Current pharmaceutical biotechnology* 13, 229–234.
272. McCormack, U.M., Curião, T., Buzoianu, S.G., Prieto, M.L., Ryan, T., Varley, P., Crispie, F., Magowan, E., Metzler-Zebeli, B.U., Berry, D., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Gardiner, G.E., Lawlor, P.G., 2017. Exploring a Possible Link between the Intestinal Microbiota and Feed Efficiency in Pigs. *Appl Environ Microbiol* 83, e00380-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00380-17>
273. McCormack, U.M., Curião, T., Metzler-Zebeli, B.U., Magowan, E., Berry, D.P., Reyer, H., Prieto, M.L., Buzoianu, S.G., Harrison, M., Rebeiz, N., Crispie, F., Cotter, P.D., O'Sullivan, O., Gardiner, G.E., Lawlor, P.G., 2019. Porcine Feed Efficiency-Associated Intestinal Microbiota and Physiological Traits: Finding Consistent Cross-Locational Biomarkers for Residual Feed Intake. *mSystems* 4, e00324-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00324-18>
274. McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R., 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *The Journal of nutrition* 129, 613–619.
275. McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., Bosch, T.C.G., Carey, H.V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A.E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S.F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A.H., Kremer, N., Mazmanian, S.K., Metcalf, J.L., Nealson, K., Pierce, N.E., Rawls, J.F., Reid, A., Ruby, E.G., Rumpho, M., Sanders, J.G., Tautz, D., Wernegreen, J.J., 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3229–3236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110>
276. McGhee, J.R., Fujihashi, K., 2012. Inside the mucosal immune system.
277. McKay, D., Baird, A., 1999. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut* 44, 283–289.
278. McKenzie, C., Tan, J., Macia, L., Mackay, C.R., 2017. The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunological Reviews* 278, 277–295. <https://doi.org/10.1111/imr.12556>
279. Mendonça, J. da S., Guimarães, R. de C.A., Zorgetto-Pinheiro, V.A., Fernandes, C.D.P., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K. de C., Hiane, P.A., de Pádua Melo, E.S., Vilela, M.L.B., 2022. Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. *Molecules* 27, 3563.
280. Meyer, B.J., Hernandez, R., 1970. Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 21, 184–188.
281. Miller, B., James, P., Smith, M., Bourne, F., 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *The Journal of Agricultural Science* 107, 579–590.
282. Miller, H., Zhang, J., KuoLee, R., Patel, G.B., Chen, W., 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World journal of gastroenterology: WJG* 13, 1477.

283. Miller, S.-A., White, J.A., Chowdhury, R., Gales, D.N., Tameru, B., Tiwari, A.K., Samuel, T., 2018. Effects of consumption of whole grape powder on basal NF- κ B signaling and inflammatory cytokine secretion in a mouse model of inflammation. *Journal of nutrition & intermediary metabolism* 11, 1–8.
284. Molendijk, I., van der Marel, S., Maljaars, P.W.J., 2019. Towards a Food Pharmacy: Immunologic Modulation through Diet. *Nutrients* 11, 1239. <https://doi.org/10.3390/nu11061239>
285. Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andres-Lacueva, C., Bartolomé, B., 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & function* 1, 233–253.
286. Montealegre, R.R., Peces, R.R., Vozmediano, J.C., Gascueña, J.M., Romero, E.G., 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 687–693.
287. Moon, H.W., 1971. Epithelial cell migration in the alimentary mucosa of the suckling pig. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 137, 151–154.
288. Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andrés-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., Queipo-Ortuño, M.I., 2016. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & function* 7, 1775–1787.
289. Morfitt, D.C., Pohlenz, J.F., 1989. Porcine colonic lymphoglandular complex: distribution, structure, and epithelium. *American journal of anatomy* 184, 41–51.
290. Mosele, J.I., Macià, A., Motilva, M.-J., 2015. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. *Molecules* 20, 17429–17468.
291. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)* 136, 2348–2357.
292. Motohashi, N., 2008. Bioactive heterocycles VI: flavonoids and anthocyanins in plants, and latest bioactive heterocycles I. Springer.
293. Muncaciu, M.L., Marin, F.Z., Nastasia, P., Babeş, A.C., 2017. Comparative polyphenolic content of grape pomace flours from ‘Fetească neagră’ and ‘Italian Riesling’ Cultivars. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj- napoca* 45, 532–539.
294. Murtaugh, M.P., Baarsch, M.J., Zhou, Y., Scamurra, R.W., Lin, G., 1996. Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 45–55.
295. Myer, M., 1982. The presence of Paneth cells confirmed in the pig.
296. Nagler-Anderson, C., 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature reviews immunology* 1, 59–67.
297. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M., Krishna, D., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology* 33, 2–16.
298. Nardoia, M., Romero, C., Brenes, A., Arija, I., Viveros, A., Ruiz-Capillas, C., Chamorro, S., 2020. Addition of fermented and unfermented grape skin in broilers’ diets: Effect on digestion, growth performance, intestinal microbiota and oxidative stability of meat. *Animal* 14, 1371–1381.
299. Nassiri-Asl, M., Hosseinzadeh, H., 2009. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 23, 1197–1204.
300. National Research Council, 2012. Nutrient Requirements of Swine: Eleventh, Reviseded. Washington DC: The National Academies Press 10, 13298.
301. Negi, P.S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology* 156, 7–17.
302. Neutra, M.R., Mantis, N.J., Kraehenbuhl, J.-P., 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature immunology* 2, 1004–1009.
303. Niture, S.K., Kaspar, J.W., Shen, J., Jaiswal, A.K., 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and applied pharmacology* 244, 37–42.
304. Nørskov-Lauritsen, N., 2014. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans. *Clin Microbiol Rev* 27, 214–240. <https://doi.org/10.1128/CMR.00103-13>
305. Ohkusa, T., Yoshida, T., Sato, N., Watanabe, S., Tajiri, H., Okayasu, I., 2009. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *Journal of medical microbiology* 58, 535–545.
306. Ohno, H., 2016. Intestinal M cells. *The journal of biochemistry* 159, 151–160.
307. O’leary, A., Sweeney, E., 1986. Lymphoglandular complexes of the colon: structure and distribution. *Histopathology* 10, 267–283.

308. Oste, M., De Vos, M., Van Haver, E., Van Brantegem, L., Thymann, T., Sangild, P., Weyns, A., Van Ginneken, C., 2010. Parenteral and enteral feeding in preterm piglets differently affects extracellular matrix proteins, enterocyte proliferation and apoptosis in the small intestine. *British journal of nutrition* 104, 989–997.
309. Oszmianski, J., Romeyer, F.M., Sapis, J., Macheix, J., 1986. Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 7–12.
310. Ou, K., Gu, L., 2014. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *Journal of Functional Foods* 7, 43–53.
311. Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B., 2014. Phenolics in human health. *International Journal of chemical engineering and applications* 5, 393–396.
312. Pabst, R., Binns, R., 1981. In vivo labelling of the spleen and mesenteric lymph nodes with fluorescein isothiocyanate for lymphocyte migration studies. *Immunology* 44, 321.
313. Pabst, R., Binns, R., Licence, S., 1985. Surface markers on lymphocytes leaving pig lymph nodes. *Immunology* 56, 301.
314. Pabst, R., Binns, R.M., 1989. Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. *Immunological reviews* 108, 83–109.
315. Pabst, R., Geist, M., Rothkötter, H., Fritz, F., 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 64, 539.
316. Pabst, R., Rothkötter, H., 1999. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72, 167–173.
317. Pabst, R., Rothkötter, H.J., 2006. Structure and function of the gut mucosal immune system. *Immune mechanisms in inflammatory bowel disease* 1–14.
318. Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science* 76, R6–R15.
319. Pall, M.L., Levine, S., 2015. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Sheng Li Xue Bao* 67, 1–18.
320. Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
321. Pandey, N., Tripathi, Y.B., 2010. Antioxidant activity of tuberosin isolated from *Pueraria tuberosa* Linn. *Journal of inflammation* 7, 1–8.
322. Park, H.J., Lee, J.-Y., Chung, M.-Y., Park, Y.-K., Bower, A.M., Koo, S.I., Giardina, C., Bruno, R.S., 2012. Green Tea Extract Suppresses NFκB Activation and Inflammatory Responses in Diet-Induced Obese Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis. *The Journal of nutrition* 142, 57–63.
323. Parkar, S.G., Stevenson, D.E., Skinner, M.A., 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology* 124, 295–298.
324. Parrott, D.M., 1976. The gut-associated lymphoid tissues and gastrointestinal immunity, in: *Immunological Aspects of the Liver and Gastrointestinal Tract*. Springer, pp. 1–32.
325. Pascariu SM, Pop IM, Simeanu D, Pavel G, Solcan C. Effects of wine by-products on growth performance, complete blood count and total antioxidant status in broilers. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 2017;19(2):191-202.
326. Pasteur, L., 1873. Études sur le vin: ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir. Simon Raçon et Comp.
327. Pawlina, W., Ross, M., Kaye, G., 2016. Histology: a text and atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology 7.
328. Peck, A., Mellins, E.D., 2010. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 129, 147–153.
329. Pekas, J.C., Wray, J.E., 1991. Principal gastrointestinal variables associated with metabolic heat production in pigs: statistical cluster analyses. *The Journal of nutrition* 121, 231–239.
330. Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñero, A.M., Nyström, E.E., 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews* 260, 8–20.
331. Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., 2009. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules* 14, 2202–2211.

332. Pérez-Cano, F.J., Massot-Cladera, M., Franch, À., Castellote, C., Castell, M., 2013. The effects of cocoa on the immune system. *Frontiers in pharmacology* 4, 71.
333. Philpott, M., Ferguson, L.R., 2004. Immunonutrition and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 551, 29–42.
334. Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* 17, 579–590.
335. Pinent, M., Castell-Auví, A., Genovese, M.I., Serrano, J., Casanova, A., Blay, M., Ardévol, A., 2016. Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 178–182.
336. Pistol, G.C., Gras, M.A., Marin, D.E., Israel-Roming, F., Stancu, M., Taranu, I., 2014. Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro-and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF- κ B signalling molecules in pigs. *British Journal of Nutrition* 111, 452–464.
337. Pistol, G.C., Marin, D.E., Rotar, M.C., Ropota, M., Taranu, I., 2020. Bioactive compounds from dietary whole grape seed meal improved colonic inflammation via inhibition of MAPKs and NF- κ B signaling in pigs with DSS induced colitis. *Journal of Functional Foods* 66, 103708. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103708>
338. Plummer, S.M., Holloway, K.A., Manson, M.M., Munks, R.J., Kaptein, A., Farrow, S., Howells, L., 1999. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- κ B activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 18, 6013–6020.
339. Podolsky, D.K., 1999. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 277, G495–G499.
340. Prior, R.L., Gu, L., 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 66, 2264–2280.
341. Proca A.C., Horodincu L., Solcan C., Solcan G. 2024. "The Potential of Grape Polyphenols Additive in Pig Nutrition: Chemical Structure, Bioavailability and Their Effect on Intestinal Health of Pigs", *Agriculture*, 14, no. 7: 1142
342. Proca A.C., Solcan C., 2023, Nrf2 overexpression and reduced p65 expression in intestinal mucosa of pigs exposed to black grape pomace powder. In *Modern Trends in the Agricultural Higher Education*, Chişinău, 2023 (pp. 141-141).
343. Proca, Andrei Claudiu, and Carmen Solcan. "Morpho-functional particularities of small intestine in Pietrain pigs." *Rom J Vet Med Pharm.* 2020; Vol. V 24(4):202-209.
344. Proca A.-C., Petrovici A., Solcan C, 2019. Reactivity of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in pigs that received in food black grapes seed and skin powder. *Lucrari Stiintifice: Seria Medicina Veterinara, Iasi.* 2019 Jul 1;62(3).
345. Prozil, S.O., Costa, E.V., Evtuguin, D.V., Lopes, L.P.C., Domingues, M.R.M., 2012. Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. *Carbohydrate research* 356, 252–259.
346. Puissant, A., Léon, H., 1967. La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Annales de Technologie Agricole* 3 (16), 217-226.(1967).
347. Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., Ojetti, V., Scarpellini, E., Gasbarrini, A., 2013. The role of intestinal microbiota and the immune system. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences* 17.
348. Quan, J., Cai, G., Ye, J., Yang, M., Ding, R., Wang, X., Zheng, E., Fu, D., Li, S., Zhou, S., Liu, D., Yang, J., Wu, Z., 2018. A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios. *Sci Rep* 8, 4536. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22692-0>
349. Quan, J., Wu, Z., Ye, Y., Peng, L., Wu, J., Ruan, D., Qiu, Y., Ding, R., Wang, X., Zheng, E., Cai, G., Huang, W., Yang, J., 2020. Metagenomic Characterization of Intestinal Regions in Pigs With Contrasting Feed Efficiency. *Front. Microbiol.* 11, 32. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00032>
350. Queipo-Ortuño, M.I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J.M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., Diaz, F.C., Andres-Lacueva, C., Tinahones, F.J., 2012. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American journal of clinical nutrition* 95, 1323–1334.
351. Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A., 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology* 72, 1439–1452.
352. Rajković, E., Schwarz, C., Tischler, D., Schedle, K., Reisinger, N., Emsenhuber, C., Ocelova, V., Roth, N., Frieten, D., Dusel, G., Gierus, M., 2021. Potential of Grape Extract in Comparison with Therapeutic Dosage

of Antibiotics in Weaning Piglets: Effects on Performance, Digestibility and Microbial Metabolites of the Ileum and Colon. *Animals* 11, 2771. <https://doi.org/10.3390/ani11102771>

353. Rankine, B.C., Kepner, R.E., Webb, A.D., 1958. Comparison of anthocyan pigments of vinifera grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 9, 105–110.
354. Reckmann, K., Blank, R., Traulsen, I., Krieter, J., 2016. Comparative life cycle assessment (LCA) of pork using different protein sources in pig feed. *Archives Animal Breeding* 59, 27–36.
355. Rescigno, M., Chieppa, M., 2005. Gut-level decisions in peace and war. *Nature medicine* 11, 254–255.
356. Reusch, M., Karasek, M., Nickoloff, B., 1988. Effect of neuropeptides present in skin on the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells and T cells. *Archives of dermatological research* 280, 279–281.
357. Reynolds, J., 1987. Peyer's patches and the early development of B lymphocytes, in: *Differentiation of B Lymphocytes*. Springer, pp. 43–56.
358. Reynolds, J., Pabst, R., Bordmann, G., 1985. Evidence for the existence of two distinct types of Peyer's patches in sheep. *Microenvironments in the lymphoid system* 101–109.
359. Reynolds, J.D., Morris, B., 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *European journal of immunology* 13, 627–635.
360. Rho, K.A., Kim, M.K., 2006. Effects of different grape formulations on antioxidative capacity, lipid peroxidation and oxidative DNA damage in aged rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 52, 33–46.
361. Ribéreau-Gayon, P., 1959. *Recherches sur les anthocyanes des végétaux: Application au genre Vitis*. Librairie générale de l'enseignement.
362. Rodríguez-Piñeiro, A.M., Bergström, J.H., Ermund, A., Gustafsson, J.K., Schütte, A., Johansson, M.E., Hansson, G.C., 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 305, G348–G356.
363. Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Schölmerich, J., Gross, V., 1998. Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357–369.
364. Romeyer, F.M., Macheix, J.-J., Sapis, J.-C., 1985. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* 25, 219–221.
365. Romier, B., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., During, A., 2009. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutrition reviews* 67, 363–378.
366. Rothkötter, H., Pabst, R., 1989. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology* 67, 103.
367. Rothkötter, H., Ulbrich, H., Pabst, R., 1991. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatric research* 29, 237–242.
368. Rothkötter, H., Zimmermann, H., Pabst, R., 1990. Size of Jejunal Peyer's Patches and Migration of Lymphocyte Subsets in Pigs after Resection or Transposition of the Continuous Heal Peyer's Patch. *Scandinavian journal of immunology* 31, 191–197.
369. Rothkötter, H.-J., 2009. Anatomical particularities of the porcine immune system—a physician's view. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 267–272.
370. Rothkötter, H.J., Hriesik, C., Barman, N.N., Pabst, R., 1999. B and also T lymphocytes migrate via gut lymph to all lymphoid organs and the gut wall, but only IgA⁺ cells accumulate in the lamina propria of the intestinal mucosa. *European journal of immunology* 29, 327–333.
371. Roży, A., Jaguś, P., Chorostowska-Wynimko, J., 2012. Probiotics in the prevention and treatment of allergic diseases. *Advances in Respiratory Medicine* 80, 65–76.
372. Saha, R.N., Jana, M., Pahan, K., 2007. MAPK p38 Regulates Transcriptional Activity of NF- κ B in Primary Human Astrocytes via Acetylation of p65. *The Journal of Immunology* 179, 7101–7109. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7101>
373. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *cell* 133, 775–787.
374. Salvadó, M.J., Casanova, E., Fernández-Iglesias, A., Arola, L., Bladé, C., 2015. Roles of proanthocyanidin rich extracts in obesity. *Food & function* 6, 1053–1071.
375. Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology* 11, 76–82.
376. Santhakumar, A.B., Battino, M., Alvarez-Suarez, J.M., 2018. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology* 113, 49–65.

377. Sasaki, K., Pabst, R., Rothkötter, H.-J., 1994. The unique ultrastructure of high-endothelial venules in inguinal lymph nodes of the pig. *Cell and tissue research* 276, 85–90.
378. Sato, M., Bagchi, D., Tosaki, A., Das, D.K., 2001. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 729–737.
379. Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C., 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 276–282.
380. Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Gerardi, V., Lopetuso, L., Gasbarrini, A., 2012. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *Journal of clinical gastroenterology* 46, S12–S17.
381. Scapagnini, G., Sonya, V., Nader, A.G., Calogero, C., Zella, D., Fabio, G., 2011. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology* 44, 192–201.
382. Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K.D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., 2006. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and cell biology* 125, 293–305.
383. Schulz, O., Pabst, O., 2013. Antigen sampling in the small intestine. *Trends in immunology* 34, 155–161.
384. Sehm, J., Lindermayer, H., Meyer, H.H.D., Pfaffl, M.W., 2006. The influence of apple- and red-wine pomace rich diet on mRNA expression of inflammatory and apoptotic markers in different piglet organs. *Anim. Sci.* 82, 877–887. <https://doi.org/10.1017/ASC200699>
385. Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* 90, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
386. Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A., Saura-Calixto, F., 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research* 53, S310–S329.
387. Shaulian, E., Karin, M., 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390–2400.
388. Sheridan, B.S., Lefrançois, L., 2010. Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect. *Current gastroenterology reports* 12, 513–521.
389. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y., 2003. Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *Journal of medicinal food* 6, 291–299.
390. Shortman, K., Heath, W.R., 2001. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nature immunology* 2, 988–989.
391. Singh, A., Holvoet, S., Mercenier, A., 2011. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical & experimental allergy* 41, 1346–1359.
392. Singla, R.K., Dubey, A.K., Garg, A., Sharma, R.K., Fiorino, M., Ameen, S.M., Haddad, M.A., Al-Hiary, M., 2019. Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International* 102, 1397–1400.
393. Singleton, V., Draper, D.E., Rossi, J.A., 1966. Paper chromatography of phenolic compounds from grapes, particularly seeds, and some variety-ripeness relationships. *American Journal of Enology and Viticulture* 17, 206–217.
394. Skrzypek, T., Piedra, J.V., Skrzypek, H., Kazimierzczak, W., Szymanczyk, S., Zabielski, R., 2010. Changes in pig small intestinal absorptive area during the first 14 days of life. *Livestock Science* 133, 53–56.
395. Skuras, D., Psaltopoulos, D., 2012. A broad overview of the main problems derived from climate change that will affect agricultural production in the Mediterranean area. *Build. Resil. Adapt. Clim. Chang. Agric. Sect* 23, 217.
396. Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., Trombetta, D., 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British journal of pharmacology* 174, 1244–1262.
397. Smith, M., 1984. Effect of postnatal development and weaning upon the capacity of pig intestinal villi to transport alanine. *The Journal of Agricultural Science* 102, 625–633.
398. Smith, M.W., 1992. Diet effects on enterocyte development. *Proceedings of the Nutrition Society* 51, 173–178.
399. Sohel, M.M.H., Amin, A., Prastowo, S., Linares-Otaya, L., Hoelker, M., Schellander, K., Tesfaye, D., 2018. Sulforaphane protects granulosa cells against oxidative stress via activation of NRF2-ARE pathway. *Cell and tissue research* 374, 629–641.
400. Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Lunney, J.K., 2000. Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *Journal of immunological methods* 241, 185–199.
401. Solcan Carmen, 2018, *Histologie Veterinară*. Ed. Ion Ionescu de la Brad Iași

402. Solcan C, Pavel G, Floristean VC, Beschea Chiriac SI, Şlencu BG, Solcan G, 2015, Effect of ochratoxin A on the intestinal mucosa and mucosa-associated lymphoid tissues in broiler chickens, *Acta Veterinaria Hungarica* vol. 63, 1, pp. 30–48, 2015
403. Song, P., Zhang, R., Wang, X., He, P., Tan, L., Ma, X., 2011. Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 6227–6232.
404. Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Moutounet, M., 2000. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1076–1080.
405. Spigno, G., Marinoni, L., Garrido, G.D., 2017. State of the art in grape processing by-products. *Handbook of grape processing by-products* 1–27.
406. Stadnyk, A.W., 1994. Cytokine production by epithelial cells 1. *The FASEB Journal* 8, 1041–1047.
407. Stead, R.H., Bienenstock, J., Stanisiz, A.M., 1987. Neuropeptide regulation of mucosal immunity. *Immunological reviews* 100, 333–359.
408. Stokes, C., Bailey, M., 2000. The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation? *Journal of biotechnology* 83, 51–55.
409. Su, C.T., Singleton, V., 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* 8, 1553–1558.
410. Sultanbawa, Y., 2011. Plant antimicrobials in food applications: Minireview. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances* 2, 1084–99.
411. Summerfield, A., McCullough, K.C., 2009. The porcine dendritic cell family. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 299–309.
412. Surai, P., 2014. Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 98, 19–31.
413. Švajger, U., Obermajer, N., Jeras, M., 2010. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology* 129, 525–535.
414. Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2011. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells* 16, 123–140.
415. Tan, Z., Yang, T., Wang, Y., Xing, K., Zhang, F., Zhao, X., Ao, H., Chen, S., Liu, J., Wang, C., 2017. Metagenomic Analysis of Cecal Microbiome Identified Microbiota and Functional Capacities Associated with Feed Efficiency in Landrace Finishing Pigs. *Front. Microbiol.* 8, 1546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01546>
416. Taranu, I., Gras, M., Pistol, G.C., Motiu, M., Marin, D.E., Lefter, N., Ropota, M., Habeanu, M., 2014. ω-3 PUFA rich Camelina oil by-products improve the systemic metabolism and spleen cell functions in fattening pigs. *PloS one* 9, e110186.
417. Taranu, I., Habeanu, M., Gras, M., Pistol, G., Lefter, N., Palade, M., Ropota, M., Sanda Chedea, V., Marin, D., 2018. Assessment of the effect of grape seed cake inclusion in the diet of healthy fattening-finishing pigs. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 102, e30–e42.
418. Taranu, I., Hermenean, A., Bulgaru, C., Pistol, G.C., Ciceu, A., Grosu, I.A., Marin, D.E., 2020. Diet containing grape seed meal by-product counteracts AFB1 toxicity in liver of pig after weaning. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 203, 110899. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110899>
419. Taranu, I., Marin, D.E., Palade, M., Pistol, G.C., Chedea, V.S., Gras, M.A., Rotar, C., 2019. Assessment of the efficacy of a grape seed waste in counteracting the changes induced by aflatoxin B1 contaminated diet on performance, plasma, liver and intestinal tissues of pigs after weaning. *Toxicon* 162, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.020>
420. Terrier, N., Ollé, D., Verriès, C., Cheynier, V., 2009. Biochemical & molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development, in: *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer, pp. 365–388.
421. Thilakarathna, S.H., Rupasinghe, H.V., 2013. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* 5, 3367–3387.
422. Tizard, I.R., 2017. *Veterinary Immunology-E-Book: Veterinary Immunology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
423. Torres, J.L., Varela, B., García, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J.J., Cascante, M., Sort, X., Bobet, R., 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 7548–7555.
424. Torres-Medina, A., 1981. Morphologic characteristics of the epithelial surface of aggregated lymphoid follicles (Peyer's patches) in the small intestine of newborn gnotobiotic calves and pigs. *American Journal of Veterinary Research* 42, 232–236.

425. Trejter, M., Brelinska, R., Warchol, J.B., Butowska, W., Neri, G., Rebuffat, P., Gottardo, L., Malendowicz, L.K., 2002. Effects of galanin on proliferation and apoptosis of immature rat thymocytes. *International journal of molecular medicine* 10, 183–186.
426. Tripura, S., K, S., K, A., K, S. A., AP, U., Tarang, M., Raghavendran, S.V., Av, S.M., Lokhande, S., KK, S., 2021. Incorporation of cooked barley residue and spent grapes in the ration of pregnant Large White Yorkshire sows and their piglets. *Tropical Animal Health and Production* 53, 1–9.
427. Trombetta, F., Fruet, A., Stefanello, F., Fonseca, P., De Souza, A., Tonetto, C., Rosado Júnior, A., Nörnberg, J., 2019. Effects of the dietary inclusion of linseed oil and grape pomace on weight gain, carcass characteristics, and meat quality of swine. *International Food Research Journal* 26.
428. Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Bornet, A., Rouanet, J.-M., Crozier, A., Teissedre, P.-L., 2005. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *British Journal of Nutrition* 94, 170–181.
429. Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246.
430. Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M., 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 285–293.
431. Tucker, A., Widowski, T., 2009. Normal profiles for deciduous dental eruption in domestic piglets: effect of sow, litter, and piglet characteristics. *Journal of animal science* 87, 2274–2281.
432. Umezawa, M., Takeda, T., Kogishi, K., Higuchi, K., Matushita, T., Wang, J., Chiba, T., Hosokawa, M., 2000. Serum lipid concentrations and mean life span are modulated by dietary polyunsaturated fatty acids in the senescence-accelerated mouse. *The Journal of nutrition* 130, 221–227.
433. Vaerman, J.-P., Langendries, A., Pabst, R., Rothkötter, H.-J., 1997. Contribution of serum IgA to intestinal lymph IgA, and vice versa, in minipigs. *Veterinary immunology and immunopathology* 58, 301–308.
434. Valeriano, V.D.V., Balolong, M.P., Kang, D.-K., 2017. Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *J Appl Microbiol* 122, 554–567. <https://doi.org/10.1111/jam.13364>
435. Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., Verma, I.M., 1996. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274, 787–789.
436. Van Der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology* 71, 241–260.
437. van Es, J.H., Clevers, H., 2014. Paneth cells. *Current Biology* 24, R547–R548.
438. van Ginneken, C., 2012. The gastrointestinal system, in: *The Minipig in Biomedical Research/McAnulty, Peter A.[Edit.]; et al.[Edit.]*. pp. 211–236.
439. Van Nassauw, L., Adriaensen, D., Timmermans, J.-P., 2007. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience* 133, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.10.003>
440. Varricchio, E., Coccia, E., Orso, G., Lombardi, V., Imperatore, R., Vito, P., Paolucci, M., 2019. Influence of polyphenols from olive mill wastewater on the gastrointestinal tract, alveolar macrophages and blood leukocytes of pigs. *Italian Journal of Animal Science*.
441. Vazquez-Torres, A., 2000. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Current Opinion in Microbiology* 3, 54–59. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00051-X)
442. Vega-Lopez, M., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K., Stokes, C., 1993. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37, 49–60.
443. Verhelst, R., Schroyen, M., Buys, N., Niewold, T., 2014. Dietary polyphenols reduce diarrhea in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infected post-weaning piglets. *Livestock Science* 160, 138–140.
444. Vermerris, W., Nicholson, R., Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. The role of phenols in plant defense. *Phenolic compound biochemistry* 211–234.
445. Verries, C., Guiraud, J.-L., Souquet, J.-M., Vialet, S., Terrier, N., Olle, D., 2008. Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5896–5904.
446. Vidanarachchi, J.K., Mikkelsen, L., Sims, I., Iji, P., Choct, M., 2005. Phytobiotics: alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feeds. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15, 131–144.
447. Vigers, S., O' Doherty, J.V., Sweeney, T., 2020. Colonic microbiome profiles for improved feed efficiency can be identified despite major effects of farm of origin and contemporary group in pigs. *Animal* 14, 2472–2480. <https://doi.org/10.1017/S1751731120001500>

448. Vigers, S., Sweeney, T., O'Shea, C.J., Kelly, A.K., O'Doherty, J.V., 2016. Pigs that are divergent in feed efficiency, differ in intestinal enzyme and nutrient transporter gene expression, nutrient digestibility and microbial activity. *Animal* 10, 1848–1855. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000847>
449. 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. *Poultry Science* 90, 566–578. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00889>
450. Vivier, M., Pretorius, I.S., 2000. Genetic improvement of grapevine: Tailoring grape varieties for the third millennium-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 5–26.
451. Vlaicu, P.A., Panaite, T.D., Cornescu, M.G., Ropota, M., Olteanu, M., Drăgoiu, D., 2019. The influence of by-products on the production parameters and nutrient digestibility in fattening pigs diet (60-100 kg). *AgroLife Scientific Journal* 8.
452. Wang, D., DuBois, R.N., 2010. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29, 781–788.
453. Wang, D., Zhang, N., Peng, Y., Qi, D., 2012. Interaction of zearalenone and soybean isoflavone in diets on the growth performance, organ development and serum parameters in prepubertal gilts. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 96, 939–946.
454. Wang, H., Xue, Y., Zhang, H., Huang, Y., Yang, G., Du, M., Zhu, M., 2013. Dietary grape seed extract ameliorates symptoms of inflammatory bowel disease in IL 10-deficient mice. *Molecular nutrition & food research* 57, 2253–2257.
455. Wang, M., Suo, X., Gu, J., Zhang, W., Fang, Q., Wang, X., 2008. Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: effect on chicken coccidiosis and antioxidant status. *Poultry Science* 87, 2273–2280.
456. Wang, R., Yu, H., Fang, H., Jin, Y., Zhao, Y., Shen, J., Zhou, C., Li, R., Wang, J., Fu, Y., 2020. Effects of dietary grape pomace on the intestinal microbiota and growth performance of weaned piglets. *Archives of animal nutrition* 74, 296–308.
457. Wang, T., Xu, R.-J., 1996. Effects of colostrum feeding on intestinal development in newborn pigs. *Neonatology* 70, 339–348.
458. Wang, X.-H., Su, T., Zhao, J., Wu, Z., Wang, D., Zhang, W.-N., Wu, Q.-X., Chen, Y., 2020. Fabrication of polysaccharides-based hydrogel films for transdermal sustained delivery of Ibuprofen. *Cellulose* 27, 10277–10292. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03503-0>
459. Wasowicz, K., Winnicka, A., Kaleczyc, J., Zalecki, M., Podlasz, P., Pidsudko, Z., 2018. Neuropeptides and lymphocyte populations in the porcine ileum and ileocecal lymph nodes during postnatal life. *PLoS One* 13, e0196458.
460. Weinges, K., Kaltenhäuser, W., Marx, H., Nader, E., Nader, F., Perner, J., Seiler, D., 1968. Zur kenntnis der proanthocyanidine, X procyanidine aus fruchten. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 711, 184–204.
461. Wen, Z.-S., Xue, R., Du, M., Tang, Z., Xiang, X.-W., Zheng, B., Qu, Y.-L., 2019. Hemp seed polysaccharides protect intestinal epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules* 135, 203–211.
462. Wenk, C., 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16, 282–289.
463. Weyrauch, K.D., Smollich, A., Plendl, J., 2009. *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Georg Thieme Verlag.
464. Willenberg, I., Meschede, A.K., Gueler, F., Jang, M.-S., Shushakova, N., Schebb, N.H., 2015. Food polyphenols fail to cause a biologically relevant reduction of COX-2 activity. *PLoS One* 10, e0139147.
465. Williamson, G., 2013. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular nutrition & food research* 57, 48–57.
466. Willstätter, R., Everest, A.E., 1913. Untersuchungen über die Anthocyane. I. Über den Farbstoff der Kornblume. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 401, 189–232.
467. Wilson, A., Haverson, K., Southgate, K., Bland, P., Stokes, C., Bailey, M., 1996. Expression of major histocompatibility complex class II antigens on normal porcine intestinal endothelium. *Immunology* 88, 98–103.
468. Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A., 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of animal science* 86, E140–E148.
469. Winkel-Shirley, B., 2001. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant physiology* 127, 1399–1404.
470. Wiyaporn, M., Thongsong, B., Kalandakanond-Thongsong, S., 2013. Growth and small intestine histomorphology of low and normal birth weight piglets during the early suckling period. *Livestock science* 158, 215–222.

471. Woods, S.C., 2004. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, G7–G13.
472. Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B., 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *IJMS* 11, 622–646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>
473. Xiao, H., Lü, F., Stewart, D., Zhang, Y., 2013. Mechanisms underlying chemopreventive effects of flavonoids via multiple signaling nodes within Nrf2-ARE and AhR-XRE gene regulatory networks. *Current Chemical Biology* 7, 151–176.
474. Xu, J., Christian, B., Jump, D.B., 2006. Regulation of rat hepatic L-pyruvate kinase promoter composition and activity by glucose, n-3 polyunsaturated fatty acids, and peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist. *Journal of Biological Chemistry* 281, 18351–18362.
475. Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., Tokutake, S., 2002. Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 4983–4988.
476. Yan, L., Kim, I., 2011. Effect of dietary grape pomace fermented by *Saccharomyces boulardii* on the growth performance, nutrient digestibility and meat quality in finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 1763–1770.
477. Yan, L., Meng, Q., Kim, I., 2011. The effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Livestock Science* 141, 143–147.
478. Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A., Tsuda, M., Suzuki, A., Hachimura, S., Takahashi, Y., Momose, Y., Itoh, K., Hirayama, K., 2013. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺ B cells. *Immunobiology* 218, 645–651.
479. Yang, H., Huang, X., Fang, S., He, M., Zhao, Y., Wu, Z., Yang, M., Zhang, Z., Chen, C., Huang, L., 2017. Unraveling the Fecal Microbiota and Metagenomic Functional Capacity Associated with Feed Efficiency in Pigs. *Front. Microbiol.* 8, 1555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01555>
480. Yang, Y.-C., Lii, C.-K., Wei, Y.-L., Li, C.-C., Lu, C.-Y., Liu, K.-L., Chen, H.-W., 2013. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- κ B pathways. *The Journal of nutritional biochemistry* 24, 204–212.
481. Yilmaz, Y., Toledo, R.T., 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 255–260.
482. Yoneyama, S., Kawai, K., Tsuno, N.H., Okaji, Y., Asakage, M., Tsuchiya, T., Yamada, J., Sunami, E., Osada, T., Kitayama, J., 2008. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of allergy and clinical immunology* 121, 209–214.
483. Yoon, M.-S., Lee, J.S., Choi, B.-M., Jeong, Y.-I., Lee, C.-M., Park, J.-H., Moon, Y., Sung, S.-C., Lee, S.K., Chang, Y.H., 2006. Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant. *Molecular pharmacology* 70, 1033–1044.
484. Young, B., O'Dowd, G., Woodford, P., 2013. *Wheater's Functional Histology-Inkling Enhanced E-Book: Wheater's Functional Histology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
485. Yu, J., Ahmedna, M., 2013. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology* 48, 221–237.
486. Yu, M., Yang, Y., Zhu, C., Guo, S., Gan, Y., 2016. Advances in the transepithelial transport of nanoparticles. *Drug discovery today* 21, 1155–1161.
487. Zhai, X., Lin, M., Zhang, F., Hu, Y., Xu, X., Li, Y., Liu, K., Ma, X., Tian, X., Yao, J., 2013. Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Molecular nutrition & food research* 57, 249–259.
488. Zhan, Z., Huang, F., Luo, J., Dai, J., Yan, X., Peng, J., 2009. Duration of feeding linseed diet influences expression of inflammation-related genes and growth performance of growing-finishing barrows. *Journal of animal science* 87, 603–611.
489. Zhang, H., Malo, C., Buddington, R.K., 1997. Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *The Journal of nutrition* 127, 418–426.
490. Zhang, H.J., Jiang, X.R., Mantovani, G., Lumbreras, A.E.V., Comi, M., Alborali, G., Savoini, G., Dell'Orto, V., Bontempo, V., 2014. Modulation of plasma antioxidant activity in weaned piglets by plant polyphenols. *Italian Journal of Animal Science* 13, 3242.
491. Zhang, Z.-Z., Che, X.-N., Pan, Q.-H., Li, X.-X., Duan, C.-Q., 2013. Transcriptional activation of flavan-3-ols biosynthesis in grape berries by UV irradiation depending on developmental stage. *Plant science* 208, 64–74.

492. Zhao, J., Pang, Y., Dixon, R.A., 2010. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant physiology* 153, 437–443.
493. Zhu, L., Zhang, Y., Lu, J., 2012. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International journal of molecular sciences* 13, 3492–3510.
494. Zimmermann, A., Camenisch, U., Rechsteiner, M.P., Bode-Lesniewska, B., Rössle, M., 2014. Value of immunohistochemistry in the detection of *BRAF*^{V600E} mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathology* 122, 48–58. <https://doi.org/10.1002/cncy.21352>
495. Žubčić, D., Kovšca Janjatović, A., Kezić, D., Špoljarić, D., Valpotić, H., Lacković, G., Anđelinović, D., Mršić, G., Popović, M., 2014. Identification, localization and quantification of porcine intestinal immune cell subsets during the first seven weeks of postnatal ontogeny. *Veterinarski arhiv* 84, 265–278.
496. Zubik, L., Meydani, M., 2003. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *The American journal of clinical nutrition* 77, 1459–1465.

ANEXA 1. LISTA ABREVIERILOR

ANNEX 1. LIST OF ABBREVIATIONS

ABTS= 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) 6-acid sulfonic
ADFI= aportul zilnic de hrană/ daily feed intake
ADG= câștigul mediu zilnic / average daily gain
APC= celule prezentatoare de antigen / antigen-presenting cells
ARNm= acidul ribonucleic mesager / messenger ribonucleic acid
CCK= colecistochinină / cholecystokinin
CD= cecule dendritice / dendritic cells
DAMP= modelele moleculare asociate daunelor / pathogen-derived molecular models
DPPH= 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
Da= daltoni
FAE= epiteliul asociat foliculilor / follicle-associated epithelium
FCR= rata de conversie a furajelor / feed conversion ratio
FRAP= putere antioxidantă reducătoare ferică / ferric reducing antioxidant power
G= gram / gram
GAE= echivalenți acid galic / gallic acid equivalents
GALT= țesutul limfoid asociat mucoasei din intestinului / mucosa-associated lymphoid tissue in the gut
GEP= sistemul endocrin gastroenteropancreatic / gastroenteropancreatic endocrine system
GS= semințe de struguri / grape seed
GSE= extract din semințe de struguri / grape seed extract
HE= colorație hematoxină eozină / hematoxylin and eosin stain
HEV= venule cu endoteliu înalt / veins with high endothelium
IEL= limfocitelor intraepiteliale / intraepithelial lymphocytes
IFN- γ = Interferonul gama / gamma interferon
IL-17= interleukina 17 / interleukin 17
IL-1 β = interleukina 1beta / interleukin 1beta
IL-2= interleukina 2 / interleukin 2
IL-4= interleukina 4 / interleukin 4
IL-5= interleukina 5 / interleukin 5
IL-6= interleukina 6 / interleukin 6
IgA= imunoglobulina A/ immunoglobulin A
Kg= kilograme/ kilograme

LE1= lot experimental 1 / experimental group 1
 LE2= lot experimental 2 / experimental group 2
 LE3= lot experimental 3 / experimental group 3
 LE4= lot experimental 4 / experimental group 4
 LM= lot martor / control group
 LPS= lipopolizaharide / lipopolysaccharide
 MALT= țesut limfoid asociat mucoasei / mucosa-associated lymphoid tissue
 MAMP= model molecular asociat microbilor / molecular pattern associated with microbes
 MCH-II= complexul major de histocompatibilitate clasa II / class II of major histocompatibility complex
 NF- κ B= factorul nuclear kappa-light-chain-enhancer al limfocitelor B activate / nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NK= celulele natural killer / natural killer cells
 Nrf2= factorul nuclear 2 legat de eritroidă 2 / nuclear factor erythroid 2-related factor 2
 PAMP= modele moleculare derivate din agenții patogeni
 PAS= colorație Periodic acid–Schiff / Periodic acid–Schiff stain
 PP= plăci Peyer / Peyer's patches
 PRR= receptorilor de recunoaștere a patogenului / pathogen recognition receptors
 RE= echivalenți rutină / routine equivalents
 RWPD= tescovină din struguri roșii/ tescovine from red grapes
 SD= abatere standard/ standard deviation
 TE= echivalenți Trolox / Trolox equivalents
 TFC= Conținut total de flavonoide / total flavonoid content
 TLR= receptorii de tip toll-like / toll-like receptors
 TNF- α = factorul de necroză tumorală alfa / tumor necrosis factor alfa
 TPC= conținut total de fenoli / total phenol content
 Th= limfocite T helper
 iIPP= plăcile Peyer din ileon / Peyer's ileum Peyer's patches
 jejPP= plăcile Peyer din jejun/ Peyer's jejunal Peyer's patches
 pIgA= imunoglobulina A secretoare / secretory immunoglobulin A

ANEXA 2. LISTA FIGURILOR

ANNEX 2. LIST OF FIGURES

- Figura 6.1.** Duoden de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Vilozițiile intestinale, lamina propria, glandele Lieberkühn și împreună cu muscularis mucosae alcătuiesc mucoasa duodenului. Sunt observate glandele Brünner în submucoasă, formate în principal din celule mucoase. (B) vilozițiile duodenale sunt alcătuite dintr-un ax central de țesut conjunctiv și un epiteliu prismatic cu platou striat de acoperire. Înălțimea enterocitelor variază de la 29-30μm în vârful viloziției la 17-18μm la baza vilozițiilor. Colorație HEx100 (A, B) (Original) / **Figure 6.1.** Duodenum of 180-day-old Pietrain pigs. (A) Intestinal villi, lamina propria, Lieberkühn glands and muscularis mucosae make up the mucosa of the duodenum. Brünner's glands are seen in the submucosa, consisting mainly of mucous cells. (B) The duodenal villi consist of a central axis of connective tissue and a prismatic epithelium with a striated plate serving as a covering. The height of the enterocytes ranges from 29-30μm at the apex of the villi to 17-18μm at the base of the villi. HEx100 staining (A, B) (Original) **68**
- Figura 6. 2.** Duoden de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Înălțimea enterocitelor de la baza vilozițiilor intestinale cu o medie de aproximativ 23μm. (B) În jurul glandelor Lieberkühn se poate observa o infiltrație limfo-plasmocitară cu numeroase limfocite și plasmocite dar și euzinofile și mastocite. Colorație HEx400 (A); Colorație PASx400 (B) (Original) / **Figure 6. 2.** Duodenum of 180-day-old Pietrain pigs. (A) Height of enterocytes at the base of the intestinal villi averaging approximately 23μm. (B) A lymphoplasmacytic infiltration can be seen around the Lieberkühn glands with numerous lymphocytes and plasma cells but also eosinophils and mast cells. HEx400 staining (A); PASx400 staining (B) (Original)..... **69**
- Figura 6.3.** Duoden de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Înălțimea enterocitelor din vârful vilozițiilor este de aproximativ 30μm. Platoul striat din cadrul epitelului de acoperire intestinală este PAS pozitiv și mult mai gros începând cu treimea mijlocie până în apexul viloziției. (B) Mușchiul Bruke poate fi observat până în vârful viloziției duodenale. Enterocitele sunt detașate de membrana bazală a epitelului. Colorație PASx1000 (A, B) (Original) / **Figure 6.3.** Duodenum of 180-day-old Pietrain pigs. (A) The height of the enterocytes at the tip of the villi is approximately 30μm. Microvilli of enterocytes are PAS positive and much thicker from the middle third to the apex of the villi. (B) Bruke's muscle can be seen up to the apex of the duodenal villi. Enterocytes are detached from the basement membrane of the epithelium. PASx1000 staining (A, B) (Original) **70**
- Figura 6.4.** Jejun de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Structura histologică a mucoasei. Vilozițiile sunt înalte, glandele Lieberkühn au o lungime cuprinsă între 380-604μm, muscularis mucosae este întreruptă din loc în loc de aglomerări limfoide localizate în submucoasă. (B) și (C) Structura histologică a submucoasei. Plăcile Peyer sunt alcătuite din limfonoduli mari înconjurați de infiltrații limfoide difuze. Grosimea totală a submucoasei și mucoasei este cuprinsă între 1473 μm și 1911μm. Colorație HEx100 (A,B), PASx1000 (C) (Original) / **Figure 6.4.** Pietrain pig jejunum at 180 days of age. (A) Histologic structure of the mucosa. The villi are high, the Lieberkühn glands are between 380-604μm in length, the muscularis mucosae is interrupted from place to place by lymphoid agglomerations localized in the submucosa. (B) and (C) Histologic outline of the submucosa. Peyer's patches consist of large lymph nodes surrounded by diffuse lymphoid infiltrates. The total thickness of the submucosa and mucosa ranges from 1473 μm to 1911μm. HEx100 staining (A,B), PASx1000 (C) (Original)..... **72**
- Figura 6.5.** Ileon de porc din rasa Pietrain în vârstă de 180 zile. (A) Numeroși limfonoduli localizați în submucoasă. (B) și (C) Structura histologică a mucoasei. Vilozițiile intestinale sunt înalte de 125-167μm, glandele Lieberkühn sunt lungi de 347-563μm, muscularis mucosae are grosimea 64-80μm și este întreruptă de limfonoduli mari cu infiltrație limfoidă difuză. Colorație HEx100 (A,B), PASx1000 (C) (Original) / **Figure 6.5.** Pietrain pig ileum at 180 days of age. (A) Numerous lymph nodes localized in the submucosa. (B) and (C) Histologic structure of the mucosa. Intestinal villi are 125-167μm high, Lieberkühn's glands are 347-563μm long, muscularis mucosae is 64-80μm thick and is interrupted by large lymph nodes with diffuse lymphoid infiltration. HEx100 staining (A,B), PASx1000 (C) (Original)..... **73**

Figura 7.1. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot martor. (A) Aspect general al peretelui duodenal (mucoasă, submucoasă și musculoasă). (B) Epiteliul de la suprafața vilozității este desprins. (C) Infiltrație limfoplasmocitară periglandulară în mucoasă. Colorație HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original) / **Figure 7.1.** Duodenum of Pietrain pig. Control group. (A) General appearance of the duodenal wall (mucosa, submucosa and muscularis). (B) The epithelium at the surface of the villous is detached. (C) Periglandular lymphoplasmacytic lymphocytic infiltration in the mucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original).....**81**

Figura 7.2. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfologiei duodenului. (A) Înălțimea vilozităților intestinale, (B) adâncimea criptelor intestinale, (C) raportul dintre înălțimea vilozităților intestinale și adâncimea criptelor, toate măsurate (μm) în fiecare grup. Valorile sunt medii ± SEM, n = 10. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4) / **Figure 7.2.** Effects of black grape tescovine polyphenols on duodenal morphology. (A) Intestinal villous height, (B) intestinal crypt depth, (C) ratio of intestinal villous height to crypt depth, all measured (μm) in each group. Values are means ± SEM, n = 10. Upper indecis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4).....**82**

Figura 7.3. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1. (A, C) Aspect general al mucoasei și submucoasei duodenale. Este observată o infiltrație limfoepitelială în lamina propria a mucoasei. (B) Glande tubuloase simple alcătuiesc stratul glandular a mucoasei. Colorație HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original) / **Figure 7.3.** Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 1. (A, C) General appearance of the duodenal mucosa and submucosa. Lymphoepithelial infiltration is seen in the lamina propria of the mucosa. (B) Simple tubular glands make up the glandular layer of the mucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original).....**83**

Figura 7.4. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2. (A) Vilozitate intestinală acoperită cu un epiteliiu columnar cu platou striat. Sunt observate numeroase limfocite intraepiteliale. (B) Infiltrație limfoepitelială înre glandele Lieberkühn. (C) Infiltrație limfoplasmocitară în mucoasă sub formă difuză a dar și organizată sub formă de limfonoduli. Colorație HEx400 (A, B), HEx100 (C) (Original) / **Figure 7.4.** Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 2. (A) Intestinal villi covered with a simple columnar epithelium. Numerous intraepithelial lymphocytes are observed. (B) Lymphoepithelial infiltration between the Lieberkühn glands. (C) Lymphoplasmacytic infiltration in the mucosa in the diffuse form of but also organized as lymph noduli. HEx400 (A, B), HEx100 (C) staining (Original) **84**

Figura 7.5. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3. (A) Vilozitate intestinală cu numeroase pliuri epiteliale laterale. (B) Infiltrație limfoplasmocitară în jurul glandele Lieberkühn. (C) Infiltrație limfoplasmocitară sub formă difuză în lamina propria și sub formă de limfonoduli în submucoasă . Colorație HEx400 (A, B), HEx100 (C) (Original) / **Figure 7.5.** Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 3. (A) Intestinal villus with numerous lateral epithelial folds. (B) Lymphoplasmacytic infiltration around the Lieberkühn glands. (C) Lymphocytic lymphoplasmacytic infiltration in diffuse form in the lamina propria and as lymph nodules in the submucosa. HEx400 (A, B), HEx100 (C) staining (Original)**85**

Figura 7.6. Duoden de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4. (A) Vilozitate intestinală cu numeroase pliuri epiteliale laterale și limfocite intraepiteliale. (B) Infiltrație limfoplasmocitară abundentă în jurul stratului glandular al mucoasei. (C) Puțini limfonoduli prezenți în submucoasă. Colorație HEx400 (A, B), HEx100 (C) (Original) / **Figure 7.6.** Duodenum of Pietrain pig. Experimental group 4. (A) Intestinal villus with numerous lateral epithelial folds and intraepithelial lymphocytes. (B) Abundant lymphoplasmacytic infiltration around the glandular layer of the mucosa. (C) Few lymph nodules present in the submucosa. HEx400 (A, B), HEx100 (C) staining (Original)**86**

Figura 7.7. Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot martor. (A) Mucoasa alcătuită din vilozități intestinale, lamina propria, glande tubuloase simple și muscularis mucosae. (B) Compoziția peretelui jejunal: mucoasă, submucoasă, musculoasă și seroasă. Colorație HEx400 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.7.** Pietrain pig jejunum. Control group. (A) Mucosa composed of intestinal villi, lamina propria, simple

- tubular glands and muscularis mucosae. (B) Composition of the jejunal wall: mucosa, submucosa, muscularis, and serosa. Staining HEx400 (A), HEx100 (B) (Original)..... **88**
- Figura 7.8.** Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1. (A) Structura peretelui jejunal: mucoasă, submucoasă, musculoasă și seroasă. (B) Infiltrație limfoidă în lamina propria. (C) Plăcile Peyer în submucoasă. Colorație HEx100 (A, C), HEx1000 (B) (Original) / **Figure 7.8.** Pietrain pig jejunum. Experimental group 1. (A) Structure of the jejunal wall: mucosal, submucosal, muscular and serosal. (B) Lymphoid infiltration in the lamina propria. (C) Peyer's plaques in submucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx1000 (B) (Original) **89**
- Figura 7.9.** Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfologiei jejunului. (A) Înălțimea vilozităților intestinale, (B) adâncimea criptelor intestinale, (C) raportul dintre înălțimea vilozităților intestinale și adâncimea criptelor, toate măsurate (μm) în fiecare grup. Valorile sunt medii ± SEM, n = 10. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0.05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4) / **Figure 7.9.** Effects of black grape tescovine polyphenols on jejunal morphology. (A) Intestinal villous height, (B) intestinal crypt depth, (C) ratio of intestinal villous height to crypt depth, all measured (μm) in each group. Values are means ± SEM, n = 10. Upper indecis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)..... **90**
- Figura 7.10.** Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra limfonodulilor din submucoasa jejunului. (A) Lungimea limfonodulilor, (B) lățimea limfonodulilor, (C) dimensiunea finală a limfonodulilor în fiecare grup. Valorile sunt calculate în μm și exprimate în medii ± SEM, n = 10. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0.05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4) / **Figure 7.10.** Effects of black grape tescovine polyphenols on lymph nodes in jejunal submucosa. (A) Lymph node length, (B) lymph node width, (C) final size of lymph nodes in each group. Values are calculated in μm and expressed as means ± SEM, n = 10. Upper indecis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)..... **911**
- Figura 7.11.** Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2. (A) Stratul glandular din mucoasa jejunului prezintă o infiltrație limfoplasmocitară. (B) Numeroși limfonoduli în submucoasă ce fac parte din plăcile Peyer. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.11.** Pietrain pig jejunum. Experimental group 2. (A) The glandular layer in the mucosa of the jejunum shows lymphoplasmacytic infiltration. (B) Numerous lymph nodes in the submucosa forming part of Peyer's plaques. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)..... **922**
- Figura 7.12.** Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3. (A) Structura histologică a mucoasei și submucoasei jejunului. Glandele Lieberkühn sunt lungi. Imediat sub muscularis mucosae se găsesc noduli limfoizi. (B) Țesutul limfoid din submucoasă este reprezentat de nodulilimfoizi cu diametrul mare. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.12.** Pietrain pig jejunum. Experimental group 3. (A) Histologic structure of the mucosa and submucosa of the jejunum. The Lieberkühn glands are long. Immediately below the muscularis mucosae are lymphoid nodules. (B) Lymphoid tissue in the submucosa is represented by large-diameter lymphoid noduli. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)..... **93**
- Figura 7.13.** Jejun de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4. (A) Infiltrație limfoepitelială în lamina propria a mucoasei. (B) Aglomerări de nodulilimfoizi în submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.13.** Pietrain pig jejunum. Experimental group 4. (A) Lymphoepithelial infiltration in the lamina propria of the mucosa. (B) Agglomerations of noduloepithelioepithelioid cells in the submucosa. HEx100 staining (A), HEx100 (B) (Original) **94**
- Figura 7.14.** Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot martor. (A) Infiltrație limfoepitelială la baza glandelor. Epiteliul desprins din vârful vilozităților. (B) Aglomerări de limfonoduli reactivi în submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.14.** Pietrain pig Ileon. Control group. (A) Lymphoepithelial infiltration at the base of the glands. Epithelium detached from the apex of the villi.

(B) Agglomerations of reactive lymphoepithelioid nodules in the submucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original).....95

Figura 7.15. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra morfologiei ileonului. (A) Înălțimea vilozităților intestinale, (B) raportul dintre înălțimea vilozităților intestinale și adâncimea criptelor, toate măsurate (μm) în fiecare grup. Valorile sunt medii $\pm$ SEM, $n = 10$. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4) / **Figure 7.15.** Effects of black grape tescovine polyphenols on ileum morphology. (A) Height of intestinal villi, (B) ratio of intestinal villous height to crypt depth, all measured (μm) in each group. Values are means $\pm$ SEM, $n = 10$. Upper indecis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)96

Figura 7.16. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra limfonodulilor din submucoasa ileonului. (A) Lungimea limfonodulilor, (B) lățimea limfonodulilor, (C) dimensiunea finală a limfonodulilor în fiecare grup. Valorile sunt calculate în μm și exprimate în medii $\pm$ SEM, $n = 10$. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4) / **Figure 7.16.** Effects of black grape tescovine polyphenols on lymph nodes in ileum submucosa. (A) Lymph node length, (B) lymph node width, (C) final size of lymph nodes in each group. Values are calculated in μm and expressed as means $\pm$ SEM, $n = 10$. Upper indecis within each group means significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)97

Figura 7.17. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1. (A, B) Infiltrație limfoepitelială în lamina propria, în jurul glandelor Lieberkühn. (C) Organizarea țesutului limfoid asociat mucoasei intestinale sub forma plăcilor Peyer. Colorație HEx400 (A), HEx1000 (B), HEx100 (C) (Original) / **Figure 7.17.** Pietrain pig ileum. Experimental group 1. (A, B) Lymphoepithelial infiltration in the lamina propria around the Lieberkühn glands. (C) Organization of intestinal mucosa-associated lymphoid tissue as Peyer's plaques. Staining HEx400 (A), HEx1000 (B), HEx100 (C) (Original).....98

Figura 7.18. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2. (A) Mucoasă ileonului alcătuită din muscularis mucosae, glande Lieberkühn, lamina propria și vilozități acoperite de un epiteliu columnar cu platou striat. (B) Aglomerări de limfonoduli reactivi în submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.18.** Pietrain pig ileum. Experimental group 2. (A) Mucosa of the ileum consisting of muscularis mucosae, Lieberkühn glands, lamina propria and villi covered by a simple columnar epithelium. (B) Agglomerations of reactive lymph nodes in the submucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original).....99

Figura 7.19. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3. (A) Glandele Lieberkühn sunt alcătuite din enterocite, celule caliciforme și celule neuroendocrine. Glandele sunt înconjurte de infiltrație limfoepitelială. (B) Plăcile Peyer alcătuite din limfonoduli mari ce trec de mucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.19.** Pietrain pig ileum. Experimental group 3. (A) Lieberkühn's glands consist of enterocytes, goblet cells and neuroendocrine cells. The glands are surrounded by lymphoepithelial infiltrate. (B) Peyer's plaques composed of large lymphonodules crossing the mucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original).....100

Figura 7.20. Ileon de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4 (A) Glandele Lieberkühn sunt înconjurte de infiltrație limfoepitelială. (B) Plăcile Peyer sunt alcătuite din numeroși limfonoduli. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.20.** Pietrain pig ileum. Experimental group 4 (A) Lieberkühn's glands are surrounded by lymphoepithelial infiltration. (B) Peyer's plaques are composed of numerous lymph nodes. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)101

Figura 7.21. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot martor (A) Glandele Lieberkühn sunt joase. Nu sunt prezente vilozități intestinale. (B) Plăcile Peyer sunt localizați în submucoasă, fiind despărțiți de mucoasă de muscularis mucosae. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.21.** Cecum of Pietrain pig. Control group (A) Lieberkühn's glands are low. No intestinal villi are present. (B)

Peyer's patches are localized in the submucosa, being separated from the mucosa by muscularis mucosae. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) **102**

Figura 7.22. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 1 (A) Structura histologică a cecumului: mucoasă, submucoasă. Musculoasă și seroasă. (B) Glandele Lieberkühn sunt alcătuite din celule caliciforme și enterocite. (B) Plăcile Peyer sunt localizate în submucoasă. Colorație HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original) / **Figure 7.22.** Cecum of Pietrain pig. Experimental group 1 (A) Histologic structure of cecum: mucosal, submucosal. Muscous and serous. (B) Lieberkühn's glands consist of goblet cells and enterocytes. (B) Peyer's plaques are localized in the submucosa. Staining HEx100 (A, C), HEx400 (B) (Original)..... **103**

Figura 7.23. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 2 (A) Glandele Lieberkühn sunt populate în special cu celule caliciforme. (B) Plăcile Peyer sunt mari și ajung până în lumenul intestinal. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.23.** Pietrain pig Cecum. Experimental group 2 (A) Lieberkühn's glands are mainly populated with goblet cells. (B) Peyer's patches are large and reach into the intestinal lumen. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) **104**

Figura 7.24. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 3 (A) Glandele Lieberkühn sunt populate în special cu celule caliciforme, fiind înconjurate de un infiltrat limfoid. (B) Plăcile Peyer sunt mari și ajung până în lumenul intestinal. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)105 / **Figure 7.24.** Cecum of Pietrain pig. Experimental group 3 (A) Lieberkühn's glands are mainly populated with goblet cells and surrounded by a lymphoid infiltrate. (B) Peyer's plaques are large and reach into the intestinal lumen. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) **105**

Figura 7.25. Cecum de porc din rasa Pietrain. Lot experimental 4 (A) Glandele Lieberkühn sunt populate în special cu celule caliciforme. (B) Sunt observați limfonoduli atât în mucoasă cât și submucoasă. Colorație HEx100 (A), HEx100 (B) (Original) / **Figure 7.25.** Cecum of Pietrain pig. Experimental group 4 (A) Lieberkühn's glands are mainly populated with goblet cells. (B) Lymph nodes are observed in both mucosa and submucosa. Staining HEx100 (A), HEx100 (B) (Original)..... **106**

Figura 8.1. Expresia IHC a markerului Il-1 β în duoden. (A) Lotul martor, (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti Il-1 β x1000 (A, C, D, E), anti Il-1 β x400 (B) / **Figure 8.1.** IHC expression of the Il-1 β marker in the duodenum. (A) Control group, (B) Experimental 1 and (C) Experimental 2. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti Il-1 β x1000 (A, C, D, E), anti Il-1 β x400 (B) **114**

Figura 8.2. Expresia IHC a markerului Il-1 β în jejun. (A) Lotul martor, (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti Il-1 β x1000 (A, C, D, E), anti Il-1 β x400 (B) / **Figure 8.2.** IHC expression of the Il-1 β marker in the jejunum. (A) Control group, (B) Experimental 1, (C) Experimental 2 and (E) Experimental group 4. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti Il-1 β x1000 (A, C, D, E), anti Il-1 β x400 (B) **115**

Figura 8.3. Expresia IHC a markerului Il-1 β în ileon. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti Il-1 β x1000 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.3.** IHC expression of the Il-1 β marker in the ileum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria. (B) Experimental batch 1 and (C) Experimental batch 2. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti Il-1 β x1000 (A, B, C, D, E)..... **116**

Figura 8.4. Expresia IHC a markerului Il-1 β în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în glandele intestinale și lamina propria. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în glandele intestinale și lamina propria. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele intestinale. Colorație IHC anti Il-1 β x400 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.4.** IHC expression of the Il-1 β marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1. Strong expression in intestinal glands and lamina propria. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in intestinal glands and lamina propria. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and intestinal glands. IHC staining anti Il-1 β x400 (A, B, C, D, E)**117**

Figura 8.5. Expresia IHC a markerului TNF- α în duoden. (A) Lotul martor. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și Brünner și în spațiul periglandular. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria și în epiteliul columnar. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria, glandele Lieberkühn, glandele Brünner și muscularis mucosae. Colorație IHC anti TNF- α x1000 (A, B, D, E), anti TNF- α x400 (C) / **Figure 8.5.** IHC expression of the TNF- α marker in the duodenum. (A) Control group. Strong expression in the Lieberkühn's and Brünner's glands and periglandular space. (B) Experimental batch 1 and (C) Experimental batch 2. Moderate expression in lamina propria and columnar epithelium. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria, Lieberkühn's glands, Brünner's glands and muscularis mucosae. IHC staining anti TNF- α x1000 (A, B, D, E), anti TNF- α x400 (C).....**118**

Figura 8.6. Expresia IHC a markerului TNF- α în jejun. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în epiteliul columnar. Colorație IHC anti TNF- α x1000 (A, B, C, E), anti TNF- α x400 (D) / **Figure 8.6.** IHC expression of TNF- α marker in the jejunum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and columnar epithelium. IHC staining anti TNF- α x1000 (A, B, C, E), anti TNF- α x400 (D)**119**

Figura 8.7. Expresia IHC a markerului TNF- α în ileon. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în epiteliul columnar. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn.. Colorație IHC anti TNF- α x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.7.** IHC expression of TNF- α marker in the ileum. (A) Control group. Strong expression in the lamina propria. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and columnar epithelium. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti TNF- α x100 (A, B, C, D, E).....**120**

Figura 8.8. Expresia IHC a markerului TNF- α în cecum. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn.. Colorație IHC anti TNF- α x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.8.** IHC expression of TNF- α marker in cecum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC anti TNF- α x100 staining (A, B, C, D, E)**121**

Figura 8.9. Expresia IHC a markerului MHC-II în duoden. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti MHC-IIx400 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.9.** IHC expression of the MHC-II marker in the duodenum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (B) Experimental group 1, (C) Experimental group 2. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D)

Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC anti MHC-IIx400 staining (A, B, C, D, E)..... **122**

Figura 8.10. Expresia IHC a markerului MHC-II în jejun. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în lamina propria. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria, epiteliul columnar și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti MHC-IIx400 (A, B, C, D), anti MHC-IIx100 (E) / **Figure 8.10.** IHC expression of MHC-II marker in jejunum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Strong expression in the lamina propria. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria, columnar epithelium and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti MHC-IIx400 (A, B, C, D), anti MHC-IIx100 (E)..... **123**

Figura 8.11. Expresia IHC a markerului MHC-II în ileon. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în lamina propria. (C) Lotul experimental 2, (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti MHC-IIx100 (A, B, C, D), anti MHC-IIx400 (E) / **Figure 8.11.** IHC expression of the MHC2 marker in the ileum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Strong expression in the lamina propria. (C) Experimental group 2, (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC staining anti MHC-IIx100 (A, B, C, D), anti MHC-IIx400 (E) **124**

Figura 8.12. Expresia IHC a markerului MHC-II în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria, în glandele Lieberkühn și în muscularis mucosae. Colorație IHC anti MHC-IIx100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.12.** IHC expression of the MHC-II marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria, Lieberkühn's glands and muscularis mucosae. IHC anti MHC-IIx100 staining (A, B, C, D, E) **125**

Figura 8.13. Expresia IHC a markerului Nrf2 în duoden. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în lamina propria și în glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti Nrf2 x400 (A, B), anti Nrf2 x100 (C, D, E) / **Figure 8.13.** IHC expression of Nrf2 marker in the duodenum (A) Control group and (B) Experimental group 1. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3. Strong expression in lamina propria and Lieberkühn glands. IHC staining anti Nrf2x400 (A, B), anti Nrf2x100 (C, D, E)..... **127**

Figura 8.14. Expresia IHC a markerului Nrf2 în jejun. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria, în glandele Lieberkühn și muscularis mucosae. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în lamina propria. Colorație IHC anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.14.** IHC expression of Nrf2 marker in the jejunum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria, Lieberkühn's glands and muscularis mucosae. (D) Experimental batch 3. Strong expression in Lieberkühn glands and lamina propria. IHC staining anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)..... **128**

Figura 8.15. Expresia IHC a markerului Nrf2 în ileon. (A) Lotul martor, (B) Lotul experimental 1, (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în lamina propria. Colorație IHC anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.15.** IHC expression of the Nrf2 marker in the ileum. (A) Control group, (B) experimental group 1, (C) experimental group 2 and (E) experimental group 4. Moderate expression

in lamina propria. (D) Experimental group 3. Strong expression in Lieberkühn glands and lamina propria. IHC staining anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E).....**129**

Figura 8.16. Expresia IHC a markerului Nrf2 în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie slabă în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și în glandele Lieberkühn. (D) Lotul experimental 3. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în lamina propria. Colorație IHC anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.16.** IHC expression of the Nrf2 marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1. Weak expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. (C) Experimental group 2 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn glands. (D) Experimental group 3. Strong expression in Lieberkühn glands and lamina propria. IHC staining anti Nrf2 x100 (A, B, C, D, E)**130**

Figura 8.17. Expresia IHC a markerului p65 în duoden. (A) Lotul martor. Expresie puternică în glandele Lieberkühn și în spațiul periglandular. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în lamina propria. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în lamina propria și glandele Lieberkühn. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.17.** IHC expression of the p65 marker in the duodenum. (A) Control group. Strong expression in Lieberkühn's glands and periglandular space. (B) Experimental batch 1 and (C) Experimental batch 2. Moderate expression in the lamina propria. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in lamina propria and Lieberkühn's glands. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E)**131**

Figura 8.18. Expresia IHC a markerului p65 în jejun. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în epiteliul columnar și lamina propria. (C) Lotul experimental 2 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în glandele intestinale, muscularis mucosae și lamina propria. (D) Lotul experimental 3. Expresie slabă în lamina propria și în glandele intestinale. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.18.** IHC expression of the p65 marker in the jejunum. (A) Control group and (B) experimental group 1. Strong expression in columnar epithelium and lamina propria. (C) Experimental 2 and (E) Experimental 4. Moderate expression in intestinal glands, muscularis mucosae and lamina propria. (D) Experimental group 3. Weak expression in lamina propria and intestinal glands. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E).....**132**

Figura 8.19. Expresia IHC a markerului p65 în ileon. (A) Lotul martor. Expresie puternică în lamina propria. (B) Lotul experimental 1 și (C) Lotul experimental 2 (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie moderată în glandele intestinale și lamina propria. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.19.** IHC expression of the p65 marker in the ileum. (A) Control group. Strong expression in lamina propria. (B) Experimental group 1 and (C) Experimental group 2 (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Moderate expression in intestinal glands and lamina propria. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E).....**133**

Figura 8.20. Expresia IHC a markerului p65 în cecum. (A) Lotul martor și (B) Lotul experimental 1. Expresie puternică în epiteliul columnar, lamina propria și muscularis mucosae. (C) Lotul experimental 2. Expresie moderată în glandele intestinale și lamina propria. (D) Lotul experimental 3 și (E) Lotul experimental 4. Expresie slabă în lamina propria și în glandele intestinale. Colorație IHC anti p65x100 (A, B, C, D, E) / **Figure 8.20.** IHC expression of the p65 marker in cecum. (A) Control group and (B) Experimental group 1. Strong expression in columnar epithelium, lamina propria and muscularis mucosae. (C) Experimental group 2. Moderate expression in intestinal glands and lamina propria. (D) Experimental group 3 and (E) Experimental group 4. Weak expression in lamina propria and intestinal glands. IHC anti p65x100 staining (A, B, C, D, E)**134**

Figura 9.1. Efectele polifenolilor din tescovina de struguri negri asupra performanței de creștere la porci. (A) Greutatea finală, (B) ADFI = Aportul zilnic de hrană, (C) ADG = Creșterea zilnică de greutate corporală și (D) FCR = Rata de conversie a hranei. Valorile sunt medii ± SEM, n = 10. Indeele superior în cadrul fiecărui grup înseamnă semnificativ diferit ($P < 0,05$). LM (lot martor); LE1 (lot experimental 1); LE2 (lot experimental 2); LE3 (lot experimental 3); LE4 (lot experimental 4) / **Figure 9.1.** Effects of black grape tescovine polyphenols on growth performance in pigs. (A) Final body weight, (B) ADFI = Daily feed intake, (C) ADG = Daily body weight gain and (D) FCR = Feed conversion ratio. Values

are means $\pm$ SEM, n = 10. Upper indices within each group mean significantly different ($P < 0.05$). LM (control group); LE1 (experimental group 1); LE2 (experimental group 2); LE3 (experimental group 3); LE4 (experimental group 4)..... **145**

ANEXA 3. LISTA TABELELOR

ANNEX 3. LIST OF TABLES

Tabel 3.1. Bioefectele polifenolilor din struguri în creșterea și producția porcilor / Table 3.1. Bioeffects of grape polyphenols in pig husbandry.....	58
Tabel 5.1. TPC, TFC și activitatea antioxidantă pentru tescovina de struguri negri / Table 5.1. TPC, TFC and antioxidant activity for black grape marc	65
Tabel 6.1. Protocol experimental pentru a evidenția particularităților morfostructurale și funcționale ale intestinului la porcii Pietrain / Table 6.1. Experimental protocol to highlight the morphostructural and functional features of the intestine in Pietrain pigs.....	Error! Bookmark not defined.
Tabel 7.1. Protocol experimental pentru introducerea în hrană a tescovinei din struguri negri / Table 7.1. Experimental protocol for feeding black grape tescovine.....	80
Tabel 7.2. Efectele introducerii tescovinei în hrana porcilor asupra morfostructurii duodenale / Table 7.2. Effects of introducing tescovine into pig feed on duodenal morphostructure....	82
Tabel 7.3. Efectele introducerii tescovinei în hrana porcilor asupra morfostructurii jejunale / Table 7.3. Effects of introducing tescovine into pig feed on jejunal morphostructure.....	87
Tabel 7.4. Efectele introducerii tescovinei în hrana porcilor asupra morfostructurii ileon / Table 7.4. Effects of introducing tescovine into pig feed on ileum morphostructure.....	96
Tabel 8.1. Expresia IHC a markerilor Il-1 β , TNF- α și MHC-II la nivelul duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la porcii hrăniți cu pudră de tescovină de struguri negri / Table 8.1. IHC expression of Il-1 β , TNF- α and MHC-II markers in the duodenum, jejunum, ileum and cecum of pigs fed black grape tescovin powder	Error! Bookmark not defined.
Tabel 8.2. Expresia IHC a markerilor Nrf2 și p65 la nivelul duodenului, jejunului, ileonului și cecumului la porcii hrăniți cu pudră de tescovină de struguri negri / Table 8.2. IHC expression of Nrf2 and p65 markers in the duodenum, jejunum, ileum and cecum of pigs fed black grape tescovin powder	Error! Bookmark not defined.
Tabel 9.1. Efectele pudrei de tescovină de struguri negri asupra performanței de creștere la porcilor în perioada de finisare / Table 9.1. Effects of black grape tescovin powder on growth performance of finishing pigs.....	Error! Bookmark not defined.

ANEXA 4. LISTA PUBLICAȚIILOR

ANNEX 4. LIST OF PUBLICATIONS

Proca A.C., Horodincu L., Solcan C., Solcan G. 2024. "The Potential of Grape Polyphenols Additive in Pig Nutrition: Chemical Structure, Bioavailability and Their Effect on Intestinal Health of Pigs", *Agriculture*, 14, no. 7: 1142

Proca A.C., Solcan C., 2023, Nrf2 overexpression and reduced p65 expression in intestinal mucosa of pigs exposed to black grape pomace powder. In *Modern Trends in the Agricultural Higher Education*, Chișinău, 2023 (pp. 141-141).

Proca, Andrei Claudiu, and Carmen Solcan. "Morpho-functional particularities of small intestine in Pietrain pigs." *Rom J Vet Med Pharm.* 2020; Vol. V 24(4):202-209.

Proca A.-C., Petrovici A., Solcan C, 2019. Reactivity of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in pigs that received in food black grapes seed and skin powder. *Lucrari Stiintifice: Seria Medicina Veterinara, Iasi.* 2019 Jul 1;62(3).