

REZUMAT

Teza de doctorat intitulată *Efectul unor antioxidanți naturali asupra țesutului limfoid asociat tubului digestiv la păsări crescute în sistem gospodăresc* a avut ca scop evaluarea efectului nutraceutic al curcuminei și ZooBior administrate în alimentația puilor broiler crescuți în sistem gospodăresc.

Lucrarea a fost redactată și structurată în două părți principale conform standardelor științifice actuale. Pentru documentație s-au folosit 426 de surse bibliografice.

Prima parte, structurată în patru capitole reflectă sinteza literaturii de specialitate privind morfofiziologia intestinală la păsări, țesutul limfoid asociat intestinului la păsări, homeostazia mucoasei și funcția de barieră, transportul transcelular sau paracelular, antioxidanți naturali utilizați ca suplimente nutritive în hrana păsărilor. Au fost sintetizate date despre *Curcuma longa* și *Spirulina platensis*.

Partea a doua *Cercetări proprii*, este structurată în 6 capitole.

Începe cu descrierea cadrului organizatoric după care sunt prezentate scopul, obiectivele urmate pentru îndeplinirea lui și se termină cu prezentarea concluziilor finale asupra studiilor abordate. La fiecare capitol sunt descrise obiectivele studiilor, materialele și metodele de lucru, rezultatele obținute, discutarea lor și sublinierea unor concluzii parțiale.

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

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

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

Dintre aditivii fitogenici utilizați în dieta păsărilor am evaluat Curcuma și produsul ZooBior pe baza de Spirulina.

Curcuma (*Curcuma longa*) conține o componentă activă numită curcumină (WuthiUdomler et al., 2000 și Mashhadani, 2015) ce variază între 2 și 5% în turmeric. Turmericul (rădăcina curcumei) este utilizat în mod obișnuit ca aditiv pentru hrana animalelor, deoarece are activitate de ameliorare a inflamației intestinale, este puternic antiviral, antibacterian, antifungic și este utilizat cu succes în producția intensivă de creștere a păsărilor și nu numai (Choudhury et al, 2019).

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

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

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

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

Prin adaosul de curcumină în dieta puilor, a crescut înălțimea vilozităților duodenale la lotul E2 iar ea mai mică valoare la lotul control. Dintre loturile experimentale cea mai mică valoare a înălțimii vilozităților s-a observat la lotul E3.

Valorile adâncimii criptelor cele mai mari le identificăm la lotul E3 (2% curcumină). Cele mai mici valori sunt la lotul E2 (1% curcumină). Lotul 1 (0,5%) are valori apropiate de cele ale lotului martor. Cel mai bun raport înălțime vilozitate: adâncime criptă se observă la lotul E2. Cel mai slab raport dintre toate loturile se observă la lotul E3. Diametrul vilozităților la baza acestora cel mai mare se remarcă la lotul E3 iar cel mai mic diametru la lotul E1.

Integritatea epiteliului intestinal, a fost conservată foarte bine la puii din LE1 și mai redusă la celalalte loturi, cea mai redusă fiind la lotul control. Infiltrațiile limfoide difuze asociate cu desprinderea epiteliului intestinal au fost mai intense la lotul control și E3 și reduse la loturile E1 și E2.

Din punct de vedere al reactivității inflamatorii, în acest experiment, s-a observat o expresie pozitivă pentru IL-6 în grupurile de control și E3, sugerând existența unui proces inflamator și foarte redusă la LE1 și LE2. Pulberea de turmeric a redus inflamația la nivelul intestinului puilor din loturile E1 și E2. Expresia TNF alpha este mai intensă în grupurile de control, moderată în lotul E3 și redusă la LE1 și LE2. Expresia TNFalfa se corelează cu IL-6 și atestă prezența unui proces inflamator la lotul control care este atenuat la celalalte loturi cel mai redus fiind la LE2. Expresia Pax-7 este pozitivă la toate loturile. A fost evaluată și expresia genei p65 care prezintă o expresie similară cu IL6 și TNF alfa, atestând astfel procesul inflamator care se reduce prin suplimentarea cu curcuma.

Suplimentarea cu doze mici și medii de curcumă duce la creșterea expresiei expresiei Nrf2, un marker care este activat de aceste suplimente. Nrf2 ajunge în nucleu și determină transcripția genelor cu rol antioxidant superoxid dismutaza și catalaza reducând astfel stresul oxidativ din timpul inflamației. Adăugarea de 1% curcumină în dieta puilor broiler din lotul 2 a dus la superexpresia Nrf2. Adăugarea de 1% și 2% curcumină în dieta puilor din E2 respectiv E3 a dus la scăderea accentuată a expresiei p65 la nivel cecal. Adăugarea în dieta păsărilor din lotul E2 de 1% curcumină duce la reducerea cea mai semnificativă a expresiei p65 și creșterea cea mai accentuată a expresiei Nrf2 în cecum. Există o legătură în cadrul proceselor de oxido reducere între creșterea expresiei Nrf2 și scăderea expresiei p65 la nivel intestinal.

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

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

În ceea ce privește consumul de furaje, cea mai scăzută cantitate consumată s-a obținut prin adaosul de 0,5% curcumină în dieta puilor în prima perioadă de creștere cu valori de 110g în primele 7 zile, 390g între 7 și 14 zile și 900g până în ziua 21. Între ziua 22 și 42 cea mai scăzută cantitate de hrană consumată s-a obținut la lotul E2 cu valori de 1400g până în ziua 29 iar până în ziua 42, 2000g. Cel mai mic indice de conversie al hranei s-a observat la lotul al doilea prin adaosul de curcumină în proporție de 1% în dieta puilor.

Greutatea puilor cea mai bună se observă la lotul E1 (0,5% curcumină) dar lotul E2 (1% curcumină) are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative. Valoarea greutateii puilor din lotul E1 în ziua 42 a fost de 2989.80 ± 32.30 g. Din punct de vedere economic cel mai avantajos este să se adauge 1% curcumină în dietă pentru creșterea greutateii corporale, întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici dintre loturile experimentale. Adaosul de 2% curcumină în hrană, la finalul perioadei experimentale, are efecte negative asupra indicatorilor mai sus menționați. Ceilalți indicatori au valori similare cu lotul martor, astfel încât nu se justifică din punct de vedere economic adaosul de 2% curcumină.

ZBR2 este un remediu natural complex care conține compuși biologic activi derivați din cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis* (SP). Acesta conține: aminoacizi, inclusiv cei imunoactivi liberi și ca părți componente ale peptidelor, respectiv proteinelor; polizaharide; polizaharide sulfatate; fosfolipide și oligoelemente zinc și seleniu (Rotaru, 2016, Rudic et al, 2004).

Cercetările au fost efectuate timp de 60 de zile, pe 70 de găini ouătoare de 23 de săptămâni din hibridul Braun-Nic, împărțite în 5 loturi, fiecare cu câte 14 păsări. Dietele constau în 5 mg/kg furaj (E1); 10 mg/kg furaj (E2); 15 mg/kg furaj (E3); 20 mg/kg furaj Zoobior (E4).

Parametrii morfometrici ce caracterizează arhitectura mucoasei au variat între lotul martor și cele experimentale la care s-a adăugat ZBR2. S-au constatat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește lungimea vilozităților și adâncimea criptelor la duoden, jejun, ileon și cecum între loturile experimentale și lotul martor. Înălțimea cea mai mare a vilozităților intestinale se observă la E 1 indiferent de segmentul studiat iar valorile cele mai mici ale înălțimii vilozităților au putut fi identificate la E4, prin adaosul celei mai mari concentrații de spirulină. Grosimea musculoasei are valorile cele mai mici la lotul 4 iar cele mai mari valori la lotul E1. Grosimea stratului muscular al duodenului și al cecumului a fost semnificativ mai mică la loturile experimentale comparativ cu lotul martor, fiind, de asemenea, implicată într-o digestibilitate mai bună a furajelor.

Diametrul vilozităților la baza acestora cel mai mare se remarcă la lotul 1 iar cel mai mic diametru la lotul 4. Valorile sunt semnificativ mai mici la loturile experimentale decât la lotul martor. În studiul nostru *S. platensis* nu a avut un efect semnificativ asupra înălțimii vilozităților și adâncimii criptelor duodenale. Includerea în rație a compusului ZBR2 a determinat o ușoară scădere a înălțimii vilozităților intestinale și a adâncimii criptelor în toate segmentele intestinale. O scădere a adâncimii criptelor este un indicator a unei rate mai mari de reînnoire a țesutului epitelial și ar putea fi implicată într-o mai bună digestibilitate a furajelor. Expresia IL-6, TNF alfa și p65 a fost mai intensă la lotul control și mai redusă de la E4, E3, E2 la E1. Fiind markeri ai inflamației se constată prezența inflamației la lotul control care scade progresiv fiind redusă la LE1, ceea ce denotă rolul antiinflamator al produsului ZBR2. Expresia Nrf2 a fost foarte intensă la LE1 și s-a redus progresiv de la E2, E3, E4 la lotul control. Aceasta diferențiere a expresiei Nrf2 explică efectul antioxidant, respectiv antiinflamator al produsului ZBR2.

Aglomerările limfoepiteliale, cu reducerea integrității barierei epiteliale, edem, s-a constatat la lotul control și LE4. La toate loturile experimentale în aceste aglomerări se evidențiază și limfonoduli în număr și dimensiuni variabile, La LE1 s-au remarcat limfonoduli mici, la celelalte loturi E2, E3 și E4 au avut dimensiuni variabile, ceva mai mari decât la LE1. Considerăm că prezența acestor limfonoduli este legată de producerea plasmocitelor secretoare de IgA prezenta în intestin care mărește răspunsul imun local,

Greutatea puilor cea mai bună s-a constatat la E1; lotul E2 are valori foarte apropiate diferențele nefiind semnificative statistic. Adaosul în dietă a compusului ZBR2 a îmbunătățit indicele de conversie al hranei și greutatea puilor. Aminoacizii esențiali abundenți care se găsesc în spirulină joacă un rol crucial în îmbunătățirea stării generale de sănătate și a greutății corporale, atenuând în același timp tulburările de sănătate și atenuând efectele stresului oxidativ.

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

Din punct de vedere clinic si economic se recomanda o doză mai mică de spirulină în dietă pentru creșterea greutateii corporale întrucât valorile indicelui de conversie al hranei și consumul de hrană sunt cele mai mici la loturile experimentale. Doza mai mare de spirulină a determinat o reducere semnificativă a înălțimii vilozităților, a raportului înălțime vilozitate: adâncime criptă și a greutateii păsărilor. Proprietățile antiinflamatorii ale spirulinei pot fi atribuite capacității sale de a inhiba sinteza citokinelor proinflamatorii, cum ar fi TNF-alfa, IL-6 și p65, precum și creșterea activității Nrf2.

Administrarea compușilor fenolici din curcumina si spirulina au redus inflamația intestinală, au îmbunătățit digestibilitatea nutrienților și metabolismul pasarilor.