

**Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Effekte einer neonatalen Glutamin-Supplementierung auf
Wachstum, mRNA-Abundanz ausgewählter Tight-Junction
Proteine und den Aminosäurenstoffwechsel bei Saugferkeln
mit niedrigem und normalem Geburtsgewicht**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Johannes Buchallik-Schregel, geb. Schregel
Tierarzt aus Bochum**

**Berlin 2024
Journal-Nr.: 4469**

Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Effekte einer neonatalen Glutamin-Supplementierung auf Wachstum, mRNA-Abundanz
ausgewählter Tight-Junction Proteine und den Aminosäurenstoffwechsel bei
Saugferkeln mit niedrigem und normalem Geburtsgewicht**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes Buchallik-Schregel, geb. Schregel
Tierarzt aus Bochum

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4469

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Cornelia C. Metges
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

piglet, piglet feeding, glutamine, supplementary feeding, amino acids, jejunum,
morphology

Tag der Promotion: 17.06.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-249-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Allgemeine Einführung	1
2. Literaturüberblick	3
2.1. Entwicklung der Wurfgröße sowie Folgen für die neonatale Entwicklung des Ferkels	3
2.1.1. <i>Auswirkungen der Wurfgröße auf das Geburtsgewicht und den Entwicklungsgrad neonataler Ferkel.....</i>	4
2.1.2. <i>Auswirkung des niedrigen Geburtsgewichtes auf die neonatale Thermoregulation und den Glukosestoffwechsel</i>	5
2.1.3. <i>Auswirkung des niedrigen Geburtsgewichtes auf die Kolostrumaufnahme</i>	6
2.1.4. <i>Bedeutung der Kolostrumaufnahme auf die Entwicklung des Dünndarms</i>	8
2.1.5. <i>Einfluss des niedrigen Geburtsgewichtes auf das Wachstum von Ferkeln während und nach der Säugephase</i>	8
2.1.6. <i>Die Bedeutung des Geburtsgewichtes für ausgewählte Parameter der neonatalen Entwicklung des porcinen Dünndarms.....</i>	9
2.1.7. <i>Die Entwicklung der Aminosäuretransporter-Abundanz im Jejunum während der Säugephase</i>	10
2.1.8. <i>Die Entwicklung des Aminosäurestoffwechsels im Jejunum während der Säugephase</i>	11
2.1.9. <i>Die Bedeutung der Darmbarriere für die Funktionalität des Darms</i>	11
2.1.10. <i>Auswirkungen eines niedrigen Geburtsgewichtes auf die Funktionalität der Darmbarriere</i>	13
2.2. Fütterungsstrategien basierend auf einzelnen Aminosäuren zur Verbesserung des Wachstums und der Darmentwicklung neonataler Ferkel	15
2.2.1. <i>Arginin-Supplementierung.....</i>	16
2.2.2. <i>Prolin-Supplementierung.....</i>	17
2.2.3. <i>Leucin-Supplementierung.....</i>	17
2.2.4. <i>Glutaminsäure-Supplementierung.....</i>	18
2.3. Die Bedeutung von Glutamin für die porcine Ernährung	19
2.3.1. <i>Effekte einer Glutamin-Supplementierung bei abgesetzten Ferkeln auf Wachstum, antioxidativen Stoffwechsel und Integrität der Darmbarriere</i>	20
2.3.2. <i>Glutamin-Supplementierung bei Saugferkeln.....</i>	21

3. Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets	23
3.1. Abstract.....	24
3.1.1. <i>Background</i>	24
3.1.2. <i>Results</i>	24
3.1.3. <i>Conclusions</i>	24
3.2. Introduction	24
3.3. Methods	26
3.3.1. <i>Animals, experimental design and sample collection</i>	26
3.3.2. <i>Jejunal morphometry, histochemistry and immunohistochemistry</i>	27
3.3.3. <i>Free and protein bound AA and AA metabolites concentration in jejunal tissue and digesta</i>	30
3.3.4. <i>Jejunal biochemical indices and fractional protein synthesis rate</i>	30
3.3.5. <i>Jejunal transcript abundances related to AA transport, AA metabolism and antioxidative defense</i>	31
3.3.6. <i>Data and statistical analysis</i>	32
3.4. Results.....	34
3.4.1. <i>Jejunal morphology and abundance of goblet cells, intraepithelial lymphocytes, and IgA positive cells</i>	34
3.4.2. <i>Jejunal free AA and AA metabolite concentrations</i>	37
3.4.3. <i>Jejunal protein bound AA concentrations</i>	37
3.4.4. <i>Free and protein bound AA concentrations in jejunal digesta</i>	38
3.4.5. <i>Jejunal biochemical indices and fractional protein synthesis</i>	41
3.4.6. <i>Jejunal transcript abundance related to AA transport, AA metabolism and antioxidative defense</i>	43
3.5. Discussion	43
3.5.1. <i>Comparison among supplementation groups</i>	43
3.5.2. <i>Comparison between birth weight groups</i>	45
3.5.3. <i>Comparison of piglet age groups</i>	46
3.6. Conclusion	48
3.7. Acknowledgments.....	48
3.8. Author Contributions	49
3.9. References	50
3.10. Supplementary material.....	62
3.11. Anteilerläuterung von Publikation mit geteilter Erstautorenschaft.....	82

4. Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets	83
4.1. Abstract.....	85
4.2. Introduction	85
4.3. Material and methods	87
4.3.1. <i>Animals, experimental design, and sample collectio</i>	87
4.3.2. <i>Measurement of milk intake</i>	88
4.3.3. <i>Jejunal morphometry and immunohistochemistry</i>	88
4.3.4. <i>Localization of tight junction proteins in jejunal tissue</i>	90
4.3.5. <i>Quantification of jejunal transcript abundances connected to barrier function, apoptosis and cellular proliferation</i>	91
4.3.6. <i>Concentration of amino acids and glutathione in jejunal tissue</i>	92
4.3.7. <i>Statistical evaluation and data presentation</i>	92
4.4. Results.....	94
4.4.1. <i>Zootechnical measurements</i>	94
4.4.2. <i>Jejunal morphometry and goblet cell abundance</i>	97
4.4.3. <i>Lymphocyte subsets in jejunal tissue</i>	100
4.4.4. <i>Incorporation of bromodeoxyuridine in jejunal tissue</i>	102
4.4.5. <i>Transcript abundance and location of tight junction proteins in jejunal tissue</i>	104
4.4.6. <i>Amino acid and glutathione concentration in plasma and jejunal tissue</i>	106
4.5. Discussion	109
4.5.1. <i>Comparison among supplementation groups</i>	109
4.5.2. <i>Comparison among birthweight groups</i>	111
4.5.3. <i>Comparison among age groups</i>	112
4.6. Conclusion	113
4.7. Acknowledgments.....	113
4.8. Author Contributions	114
4.9. References	115
4.10. Supplementary material.....	122
4.11. Anteilerläuterung von Publikation mit alleiniger Erstautorenschaft.....	137

5. Allgemeine Diskussion	139
5.1. Methodische Aspekte	139
5.1.1. <i>Methodische Überlegungen bei Auswahl der Kontrolldiät.....</i>	<i>139</i>
5.1.2. <i>Allgemeine Überlegungen bei Untersuchungen an Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht.....</i>	<i>140</i>
5.1.3. <i>Studienspezifische Überlegungen bei Untersuchungen an Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht.....</i>	<i>141</i>
5.1.4. <i>Weitere studienspezifische Überlegungen zum tierexperimentellen Teil der Studie ...</i>	<i>143</i>
5.1.5. <i>Methodische Problematiken bei der Quantifizierung von Tight Junction-Proteinen.....</i>	<i>144</i>
5.2. Effekte einer neonatalen Gln-Supplementierung auf Wachstum und ausgewählte jejunale Entwicklungsparameter	144
5.2.1. <i>Alternative Supplementierungsstrategien.....</i>	<i>146</i>
5.3. Effekte des niedrigen Geburtsgewichtes auf Wachstum und ausgewählte jejunale Entwicklungsparameter	147
5.4. Alterseffekte auf ausgewählte Entwicklungsparameter des Jejunums	149
5.5. Potentielle weitere Forschungsfragen	152
6. Fazit	153
7. Zusammenfassung.....	155
8. Summary	157
9. Literaturverzeichnis	159
10. Anhang	185
10.1. Publikationsverzeichnis	185
10.1.1. <i>Begutachtete Publikationen (peer reviewed publications).....</i>	<i>185</i>
10.1.2. <i>Begutachtete Kurzfassungen (peer reviewed abstracts).....</i>	<i>186</i>
10.2. Danksagung.....	189
10.3. Finanzierungsquellen.....	191
10.4. Interessenkonflikt.....	192
10.5. Selbständigkeitserklärung.....	193

Tabellenverzeichnis

Kapitel 3: Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

Table 3.1 Jejunal morphology characteristics in low and normal birth weight male suckling piglets

Table 3.2 Number of jejunal goblet cells in low and normal birth weight male suckling piglets.

Table 3.3 Jejunal biochemical indices in low and normal birth weight male suckling piglets.

Supplementary Table 3.4. S1. Primer sequences

Supplementary Table 3.5. S2 Number of jejunal IgA positive cells in low and normal birth weight male suckling piglets

Supplementary Table 3.6. S3 Jejunal villi intraepithelial CD3 positive cells from suckling low and normal birth weight male piglets

Supplementary Table 3.7. S4 Concentrations of jejunal free amino acids in suckling low and normal birth weight male piglets

Supplementary Table 3.8. S5 Jejunal amino metabolites from suckling low and normal birth weight male piglets

Supplementary Table 3.9. S6 Volcano plot of jejunal variables analysed between 5 and 12 day old suckling piglets

Supplementary Table 3.10. S7 Jejunal protein bound amino acids from suckling low and normal birth weight male piglets at the age of 5 d and 12 d

Supplementary Table 3.11. S8 Jejunal digesta free amino acid concentrations from suckling low and normal birth weight male piglets

Supplementary Table 3.12. S9 Jejunal digesta amino metabolites concentrations from suckling low and normal birth weight male piglets

Supplementary Table 3.13. S10 Jejunal protein bound amino acid concentrations from suckling low and normal birth weight male piglets

Supplementary Table 3.14. S11 Jejunal mRNA abundance from suckling low and normal birth weight male piglets

Kapitel 4: Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Table 4.1 Acute (age day 12) and persistent (age days 13–26) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on zootechnical measurements in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets

Table 4.2 Acute (12-day group) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on jejunal morphometry and the abundance of goblet cells in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Table 4.3 Acute (12-day group) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the abundance of CD3 positive and IgA positive lymphocytes in the jejunum of low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Table 4.4 Acute (5-day and 12-day groups) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) in jejunal tissue in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Table 4.5 Acute (5-day and 12-day groups) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the mRNA abundance of tight junction proteins, and targets of cellular proliferation and apoptosis in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Table 4.6 Acute (12-day group) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the concentration of free and protein-bound amino acids (FAA, PBAA), in plasma and jejunal tissue as well as the concentration of glutathione in jejunal tissue in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Supplementary Table 4.7 S1 Nutrient composition of supplementary creep feed

Supplementary Table 4.8 S2 Primer sequences

Abbildungsverzeichnis

Kapitel 2: Literaturüberblick

Abbildung 2.1. Vergleichende Darstellung der Strukturformeln von Glutamat und Glutamin sowie schematische Darstellung der Glutaminsynthese und der Glutaminhydrolyse bei einem *physiologischen* pH-Wert (pH 7,4) (adaptiert nach Branitzki-Heinemann 2020)

Kapitel 3: Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

Figure 3.1 Jejunal Histomorphology and Immunohistochemistry (IHC) of 5 d and 12 d old male suckling piglets. A Alcian blue pH 2.5-periodic acid Schiff stained jejunal tissue with stained goblet cells, different arrows indicating goblet cells containing different mucins

Figure 3.2 Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA).

Figure 3.3 Volcano plot of jejunal variables analysed between 5 and 12 d old suckling piglets.

Supplementary Figure 3.4 S1 Sample plots of block PLS-DA

Kapitel 4: Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Figure 4.1 Jejunal histomorphology and immunohistochemistry of 5-, 12-, and 26-day-old suckling piglets.

Supplementary Figure 4.2 S1 Bromodeoxyuridine incorporation into proliferating jejunal cells.

Supplementary Figure 4.3 S2 Bromodeoxyuridine incorporation in the crypt area of jejunal cross sections.

Supplementary Figure 4.4 S3 Bromodeoxyuridine incorporation in proliferating jejunal cells of the villus area

Supplementary Figure 4.5 S4 Immunohistochemical images of tight junction protein 1 in the villus area of jejunal cross sections.

Supplementary Figure 4.6 S5 Immunohistochemical images of tight junction protein 1 in the crypt area of jejunal cross sections

Supplementary Figure 4.7 S6 Immunohistochemical images of tight junction protein 2 in the villus *area* of jejunal cross sections.

Supplementary Figure 4.8 S7 Immunohistochemical images of tight junction protein 2 in the crypt area of jejunal cross sections

Supplementary Figure 4.9 S8 Immunohistochemical images of claudin-4 in in the villus area of jejunal cross sections.

Supplementary Figure 4.10 S9 Immunohistochemical images of claudin-4 in the crypt area of jejunal cross sections

Supplementary Figure 4.11 S10 Immunohistochemical images of occludin in in the villus area of jejunal cross sections.

Supplementary Figure 4.12 S11 Immunohistochemical images of occludin in the crypt area of jejunal cross sections

Abkürzungsverzeichnis

Ala = Alanin

Arg = Arginin

AS = Aminosäure

BMI = Body-Mass-Index

BrdU = Bromdesoxyuridin

BW = Körpergewicht

Cys = Cystein

FPSR = Fraktionelle Proteinsyntheserate

Gln = Glutamin

Glu = Glutamat

GIT = Gastrointestinaltrakt

GSH = Glutathion

GSSG = Glutathion-Disulfid

IGF = Insuline-like growth factor

IHC = Immunhistochemie

IUGR = Intrauterine Growth Retardation

LBW = niedriges Geburtsgewicht

Leu = Leucin

Lys = Lysin

NBW = normales Geburtsgewicht

mRNA = Messenger RNA

PCNA = Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen

Pro = Prolin

TJP = Tight junction protein

1. Allgemeine Einführung

Im Verlauf der letzten drei Jahrzehnte hat die Größe der Würfe in der weltweiten Schweineproduktion stetig zugenommen (Oliviero et al. 2019). Bei einer steigenden Anzahl von Ferkeln pro Wurf nimmt das durchschnittliche Geburtsgewicht ab und die Anzahl der Ferkel mit einem niedrigen Geburtsgewicht (engl. low birth weight) (**LBW**) (< 1,0 kg) zu (Brandt 2014; Huting et al. 2021). Zahlreiche Studien zeigen, dass die Mortalität von LBW-Ferkeln im Vergleich zu Schweinen mit durchschnittlichen oder normalen Geburtsgewichten (**NBW**) während der Säugephase erhöht ist (Hales et al. 2013; Geiping und Große Beilage 2020; Mbutia et al 2023). Hohe Verlusten sind ethisch nur schwer zu vertreten (Beaulieu et al. 2010) und sind mit ökonomischen Verlusten verbunden (Marchant et al. 2000). Verschiedene Übersichtsarbeiten bestätigen, dass ein Großteil der Verluste in den ersten drei Lebenstagen bzw. in der ersten Lebenswoche auftreten, wobei besonders Ferkel mit einem niedrigem Geburtsgewicht in diesem Zeitraum verenden (Oliviero et al. 2019; Geiping und Große Beilage 2020). Zu erklären ist dies unter anderem durch sehr große Würfe. Die größeren Würfe bedingen, dass sich der Konkurrenzkampf um Nährstoffe und Sauerstoff im Uterus der Sauen verschärft, dass die Dauer der Geburten verlängert wird (Oliviero et al. 2019) und sich die Verfügbarkeit von Milch bzw. Kolostrum in der postnatalen Entwicklung verknappt (Quesnel et al. 2012; Huting et al. 2021; Quesnel et al. 2023). Von dieser Entwicklung sind LBW-Ferkel in vielerlei Hinsicht beeinflusst. Verschiedene Organsysteme werden von dieser intrauterinen Unterentwicklung beeinflusst, wobei u.a. die absolute Länge des Dünndarms dieser Tiere verkürzt und die Masse der Skelettmuskulatur und der Leber geringer ist (Xu et al. 1994; D'inca et al. 2010). Wiederholt haben Studien den Einfluss des Geburtsgewichts auf die Entwicklung des porcinen neonatalen Dünndarms untersucht (Everaert et al. 2017). Studien mit ungesäugten neonatalen Ferkeln demonstrierten, dass sich das niedrige Geburtsgewicht auf verschiedene intestinale Parameter, wie die Morphologie, (Xu et al. 1994), die Funktion der Darmbarriere (Wang et al. 2016c) und den antioxidativen Status (Wang et al. 2016c), negativ auswirkt. Außerdem stehen LBW- im Vergleich zu NBW-Wurfgeschwistern geringere Energiereserven zur Verfügung (Hales et al. 2013). Weiterhin besitzen LBW-Ferkel ein geringeres Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpervolumen und konsumieren geringere Mengen an Kolostrum (Geiping und Große Beilage 2020). Kolostrum enthält neben überlebenswichtigen Immunglobulinen und Nährstoffen auch Wachstumsfaktoren, wie IGF (engl. Insulin-like growth factor), die sich positiv auf die Entwicklung des Dünndarms auswirken (Xu et al. 2000). Somit ermöglicht die neonatale Kolostrumaufnahme das rasche Wachstum des Dünndarms (Adeola und King 2006; Huygelen et al. 2015). Dadurch sind LBW-Ferkel in späteren Entwicklungsprozessen in vielerlei Hinsicht benachteiligt (Morise et al. 2008; Ferenc

et al. 2018). In den letzten Jahren legten verschiedene Studien offen, dass der Dünndarm nicht nur aktiv Aminosäuren (**AS**) absorbiert, sondern auch metabolisiert (Stoll und Burrin 2006). Hierbei nehmen Glutamat (**Glu**) und Glutamin (**Gln**) eine besondere Rolle ein, da sie zu einem großen Prozentsatz in den Epithelzellen des Jejunums verstoffwechselt werden (Windmueller 1984). Gleichzeitig ist die Konzentration der beiden AS am höchsten in der Milch von Sauen und auch in der Milch verschiedener anderer Spezies (Davis et al. 1994). Neben der Funktion als Baustein für Proteine und Energielieferant kommen Gln im Körper von Säugetieren weitere Aufgaben zu. Mit seinen zwei Aminogruppen fungiert Gln als Vehikel des Stickstofftransportes im Organismus (Cruzat et al. 2018). Außerdem dient Gln als Grundgerüst für die Synthese des körpereigenen Antioxidans Glutathion (**GSH**) (Wang et al. 2008). In zahlreichen *in-vitro*-Versuchen mit porcinen intestinalen Zellkulturen wurden positive Effekte von Gln auf die Zellproliferation (Ko et al. 1993), die fraktionelle Proteinsyntheserate (**FPSR**) (Xi et al. 2012), die antioxidative Abwehr (Haynes et al. 2009) und die Darmbarriere (Wang et al. 2016a) beobachtet. Diverse Studien mit abgesetzten Ferkeln demonstrierten einen positiven Einfluss von Gln auf die intestinale Morphologie, die antioxidative Abwehr und das Wachstum der Ferkel (Wang et al. 2008; Cabrera et al. 2013; Duttlinger et al. 2019; Ji et al. 2019; Luise et al. 2023). Die wenigen Studien zur Wirkung einer Gln-Supplementierung beim Saugferkel berichten über einen positiven Einfluss von Gln vor allem auf das Wachstum von Ferkeln (Haynes et al. 2009; Wu et al. 2011; Li et al. 2022), woraus Wu et al. (2011) postulierten, dass die in der Milch enthaltene Menge an Gln nicht für ein optimales Wachstum adäquat sei. Untersuchungen über die Effekte einer Gln-Supplementierung bei LBW-Saugferkeln auf die Darmentwicklung wurden bisher noch nicht veröffentlicht. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte einer Gln-Supplementierung auf verschiedene Parameter der jejunalen Entwicklung zu untersuchen und zu klären, ob die gestörte Entwicklung des Jejunums von LBW-Ferkeln durch Gln-Supplementierung gelindert werden kann.

2. Literaturüberblick

2.1. Entwicklung der Wurfgröße sowie Folgen für die neonatale Entwicklung des Ferkels

In polytoken Spezies wie dem Schwein ist der Verlust von vereinzelt Tieren pro Wurf kaum zu vermeiden (Edwards 2002). Jedoch führt eine hohe Mortalität während der Säugephase zu ökonomischen Verlusten (Marchant et al. 2000) und ist aus ethischer Perspektive fragwürdig (Beaulieu et al. 2010). Daten aus internationalen Studien (Oliviero et al. 2019; Farmer 2020; Geiping und Große Beilage 2020) und die Berichte von verschiedenen Erzeugergemeinschaften innerhalb der Bundesrepublik Deutschland (Reinecke und Müller 2020; Rinken 2020) zeigen, dass im vergangenen Jahrzehnt die Zahl der Ferkel pro Wurf zugenommen hat. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug im Erzeugerverband Westfalen im obersten Quartil der kommerziell erfolgreichsten Betriebe im Jahr 2000 10,9 lebend geborene Ferkel pro Wurf (Freisfeld 2000). Im Jahr 2018/19 wurden durchschnittlich im gleichen Erzeugerverband 15,4 Ferkel pro Wurf lebend geboren (Rinken 2020). Ein Vergleich der Mortalitätsraten zeigt, dass die Mortalitätsrate der Ferkel im Jahr 1999/2000 15,8 % betrug (Freisfeld 2000) und für das Jahr 2018/19 bei 18,9 % lag (Rinken 2020). Der Anstieg der Grundgesamtheit und der Anstieg der Mortalitätsrate bedingen, dass die absolute Häufigkeit der Saugferkelverluste zugenommen hat. Dennoch wurden mehr Ferkel pro Jahr und Sau abgesetzt (Rinken 2020). Aktuellere Daten eines deutschlandweit agierenden Zuchtunternehmens zeigen jedoch, dass im Zeitraum 2018 - 2022 die Zahl der lebend geborenen Ferkel von durchschnittlich 14,9 geborenen Ferkeln auf 15,6 geborene Ferkel gestiegen ist und sich im gleichen Zeitraum die durchschnittliche Aufzuchtquote um ca. einen Prozentpunkt verbessert hat (Vzf 2022).

Ein Großteil der Ferkel, die während der Säugephase verenden, versterben während der ersten 72 Stunden nach der Geburt (Farmer 2014; Geiping und Große Beilage 2020). Dabei verenden männliche Ferkel deutlich häufiger während der Säugephase als weibliche Ferkel (Baxter et al. 2012). Die meisten Ferkel werden hierbei durch die Sau erdrückt, welches die häufigste Todesursache für die Ferkel darstellt (Andersen et al. 2011; Hales et al. 2013). Bei dieser Todesursache besteht ein multifaktorieller Zusammenhang, wobei die einzelnen Faktoren vielschichtig miteinander verwoben sind (Edwards 2002). Ein niedriges Geburtsgewicht und große Würfe sind hierbei entscheidende Faktoren für die hohe Mortalität in der neonatalen Periode (Edwards 2002; Geiping und Große Beilage 2020). Zusätzlich sei erwähnt, dass die größere Anzahl an Ferkeln pro Wurf auch bedingt, dass die Geburt einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt (Oliviero et al. 2019). Diese Tatsache hat wiederum

Auswirkungen auf die Anzahl der totgeborenen Ferkel und die Anzahl der Ferkel, die mit Asphyxie geboren werden (Langendijk und Plush 2019). Eine Asphyxie geht mit einer Hypoxie und einer metabolischen Azidose (Geiping und Große Beilage 2020) einher, welche wiederum mit einer Lethargie verbunden ist. Dadurch wird die Aufnahme von Kolostrum verringert und die Gefahr, von der Sau erdrückt zu werden, steigt.

2.1.1. Auswirkungen der Wurfgröße auf das Geburtsgewicht und den Entwicklungsgrad neonataler Ferkel

Bei einer Zunahme der Wurfgröße nimmt das Gesamtgewicht des Wurfes nicht proportional zu (Wu et al. 2006). Dies führt dazu, dass mehr LBW-Ferkel geboren werden (Huting et al. 2021). Der Begriff LBW und seine Definition werden im Zusammenhang mit der Spezies Schwein in einem späteren Kapitel (5.1.2) ausführlich diskutiert. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Definition bei Haus- und Nutztieren weniger einheitlich ist als beim Menschen (Mugnier et al. 2023). Ein niedriges Geburtsgewicht erklärt sich unter anderem dadurch, dass die plazentare Versorgung mit Nährstoffen während der intrauterinen Entwicklung nicht in vollem Umfang gewährleistet wird (Wu et al. 2006), was wiederum mit einem herabgesetzten Blutfluss und mangelnder Angiogenese assoziiert wird (Oliviero et al. 2019). Extreme Formen der Nährstoffunterversorgung werden als intrauterine Wachstumsretardierung bezeichnet (Wientjes et al. 2013) (engl. Intrauterine growth retardation (**IUGR**)). Eine Möglichkeit, den Schweregrad von IUGR bei Ferkeln zu quantifizieren, ist die Beurteilung der Kopfform (Hales et al. 2013). Anzeichen für IUGR sind: eine Kopfform, die an einen Delfinkopf erinnert, vorgewölbte Augen und senkrecht zum Maul verlaufende Falten (Hales et al. 2013). Ein vermehrtes Auftreten von IUGR kann auch experimentell durch eine inadäquate maternale Ernährung ausgelöst werden (Mickiewicz et al. 2012). Auch bei einer bedarfsgerechten maternalen Nährstoffversorgung wird IUGR bei Ferkeln beobachtet und steht mit einer herabgesetzten Transportkapazität der Plazenta in Verbindung (Foxcroft et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass das Gewicht der Plazenta proportional zum fetalen Gewicht ist (Van Rens und Van Der Lende 2004) und ein geringes Plazentagewicht mit einem erhöhten Risiko während der Säugephase zu verenden assoziiert ist (Rootwelt et al. 2012). Auch das Alter der Sau hat einen Einfluss auf das Geburtsgewicht der Ferkel (Wientjes et al. 2013), da sich Jungsauen bei der ersten Belegung für gewöhnlich noch im Wachstum befinden und somit Ferkel und Sau um die gleichen Ressourcen konkurrieren. Dadurch sind Ferkel aus Würfen von Jungsauen kleiner und leichter als Ferkel aus Würfen von Altsauen (Craig et al. 2019). Verschiedene Untersuchungen dokumentieren, dass gerade LBW- und IUGR-Ferkel deutlich häufiger während der Säugephase verenden als ihre NBW-Wurfgeschwister (Amdi et al. 2013; Hales et al. 2013; Geiping und Große Beilage 2020). Ebenso sind diese Ferkel in ihrem späteren Wachstum beeinträchtigt (Smit et al. 2013).

Die Auswirkungen von IUGR betreffen hierbei nicht nur das Geburtsgewicht der Ferkel, sondern auch die Funktionalität verschiedener Organsysteme (Van Ginneken et al. 2022). So besitzen Ferkel mit IUGR im Vergleich zu NBW-Ferkeln eine geringere Muskelmasse und relativ zum Körpergewicht (engl. bodyweight (**BW**)) größere Herzen, Lungen und Gehirne (Lynegaard et al. 2019). Diese Entwicklung ist darauf zurückzuführen, dass bestimmte Organe in der Entwicklung vom Organismus mit Nährstoffen und Sauerstoff priorisiert werden, wobei andere Organsysteme, z.B. die Skelettmuskulatur, in der Entwicklung vernachlässigt werden (Bauer et al. 1998; Benítez-Marín et al. 2021). Auf die Auswirkungen von IUGR und LBW auf die Funktionalität und Entwicklung des Gastrointestinaltraktes (**GIT**) wird in einem späteren Kapitel eingegangen (Siehe 2.1.10.). Somit beeinflusst das niedrige Geburtsgewicht das Überleben und die Entwicklung dieser Ferkel auf mehreren Ebenen negativ (Van Ginneken et al. 2022).

2.1.2. Auswirkung des niedrigen Geburtsgewichtes auf die neonatale Thermoregulation und den Glukosestoffwechsel

Ein niedriges Geburtsgewicht führt dazu, dass das Körpermasse-zu-Körperoberflächen-Verhältnis geringer ist, welches sich durch einen geringeren Body-Mass-Index (BMI) äußert (Hales et al. 2013). Somit verlieren Ferkel mit einem niedrigen Geburtsgewicht mehr Wärme an die kühlere Umgebung (Amdi et al. 2013). Generell sind neugeborene Ferkel wegen des fehlenden braunen Fettgewebes (Hou et al. 2017), der geringen Fettreserven, ihrer Haarlosigkeit und dem abrupten Abfall der Umgebungstemperatur nach der Geburt einer hohen Gefahr ausgesetzt, eine Hypothermie zu erleiden (Herpin et al. 2002; Geiping und Große Beilage 2020). Hier kommt hinzu, dass die Ferkel nach der Geburt mit Fruchtwasser benetzt sind und durch das Verdunsten dieser Flüssigkeit dem Ferkel weitere Energie entzogen wird (Herpin et al. 2002; Farmer 2020). Die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ist mit einer Metabolisierung körpereigener Energiereserven verbunden (Herpin et al. 2002). Glykogen stellt in der frühen neonatalen Phase die Hauptenergiereserve dar (Theil et al. 2011). Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht stehen wegen der geringeren Größe der Leber und der geringeren Muskelmasse auch nur kleinere Glykogenspeicher zur Verfügung (Amdi et al. 2013). Aufgrund der herabgesetzten thermoregulatorischen Fähigkeiten wird die erhöhte Mortalität von LBW-Ferkeln mit einer Hypothermie assoziiert (Geiping und Große Beilage 2020). Wie bereits zuvor erwähnt, ist die neonatale Mortalität bei Ferkeln in einem multikausalen Zusammenhang zu betrachten. Die einzelnen Faktoren interagieren dabei miteinander. Beispielsweise ist die Hypothermie eng mit einer Hypoglykämie verbunden. Ferkel, die perspektivisch während der ersten drei Tage nach der Geburt verenden, zeigten 24 Stunden nach der Geburt im Durchschnitt eine geringere Rektaltemperatur, sowie eine niedrigere Glucose-Konzentration im Plasma und ein niedrigeres BW als diejenigen Ferkel,

die bis zum Absetzen überlebten (Devillers et al. 2011). Um Ihren Bedarf an Glucose zu decken, ist es zwingend notwendig, dass Ferkel möglichst zeitnah Kolostrum aufnehmen, um diesen Kreislauf zu unterbrechen (Declerck et al. 2016).

2.1.3. Auswirkung des niedrigen Geburtsgewichtes auf die Kolostrumaufnahme

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, besitzen neonatale Ferkel nur geringe Energiereserven und sind auch aus metabolischen Gründen auf die Aufnahme maternalen Kolostrums angewiesen (Herpin et al. 1994). An dieser Stelle sei betont, dass die neonatale Kolostrumaufnahme eine Vielzahl von Funktionen erfüllt. Kurzfristig versorgt das Kolostrum das neugeborene Ferkel mit Energie (Theil et al. 2014), während der Transfer der maternalen Immunität in Form von Immunglobulinen, Interferonen und Leukozyten für das langfristige Überleben und die Etablierung einer adäquaten Immunantwort des Ferkels unverzichtbar ist (Bandrick et al. 2014). Ferkel werden mit einer Hypogammaglobulinämie geboren und sind auf einen Transfer von Immunglobulinen durch das Kolostrum angewiesen, da der Aufbau der porcinen Plazenta (*Placenta epitheliochorialis*) einen Transport von Makromolekülen, wie Immunglobulinen, verhindert (Salmon et al. 2009; Weström et al. 2020). Zur Bedeutung des Kolostrums für die intestinale Reifung wird auf das folgende Kapitel verwiesen (siehe 2.1.4.). Verschiedene Studien zeigen, dass Ferkel, die von IUGR betroffen sind, 24 Stunden nach der Geburt ein geringeres BW besitzen, weniger Kolostrum aufgenommen haben, und diesen Tieren geringere Glykogenreserven zur Verfügung stehen als den NBW-Kontrolltieren ohne Anzeichen von IUGR (Devillers et al. 2011; Amdi et al. 2013). Eine Untersuchung von Ferkeln, die während der Säugephase verendeten, kommt zu dem Ergebnis, dass ein Großteil der verendeten Tiere nur wenig bis keine Milch oder Kolostrum in ihrem Magen hatten und gleichzeitig ein geringeres Geburtsgewicht sowie ausgeprägtere klinische Anzeichen von IUGR aufwiesen (Hales et al. 2013). Zusätzlich ist das relative Magenvolumen von IUGR-Ferkeln geringer und limitiert so zusätzlich die maximale Kolostrumaufnahmemenge (Lynegaard et al. 2020). Damit wird deutlich, dass nicht nur eine geringe Körpertemperatur, sondern auch eine geringe Kolostrumaufnahme Risikofaktoren für das Verenden während der neonatalen Phase sind und beide Parameter häufiger bei LBW-Ferkeln beobachtet werden (Geiping und Große Beilage 2020). In den drei zuvor vorgestellten Studien und der Übersichtsarbeit von Geiping und Große Beilage (2020) stellt das Erdrücken durch die Sau die häufigste Todesursache dar und wird mit einer herabgesetzten Mobilität von hypothermen und hypoglykämischen Tieren in Verbindung gebracht. Weiterhin besteht die Theorie, dass sich oben beschriebene Ferkel wegen ihres Hungergefühls öfter näher bei der Sau aufhalten und deshalb häufiger erdrückt werden (Geiping und Große Beilage 2020). Außerdem haben weitere maternale Faktoren wie das Alter der Sau, ihr Verhalten, der Gesundheitsstatus, der

Geburtsverlauf, die Fütterung und die Haltungsbedingungen einen Einfluss auf die Kolostrummenge und -qualität (Farmer 2014), welches wiederum die Verfügbarkeit von Kolostrum für die Ferkel beeinflusst. Insgesamt ist die maternale Kolostrumproduktion tierindividuell sehr variabel und schwankt zwischen 1,91 kg und 5,31 kg (Farmer et al. 2006). Ebenfalls ist die Zusammensetzung des Kolostrums stark variabel und ist zum Beispiel von Faktoren wie Genetik, Fütterung und Alter der Sauen abhängig (Farmer 2014). Zusätzlich nimmt der Gehalt an Feststoffen, Proteinen und Immunglobulinen schon in den ersten vier Stunden nach der Geburt ab und führt dazu (Farmer 2014), dass Ferkel, welche zuletzt im Wurf geboren wurden, u. U. einem höheren Risiko ausgesetzt sind, nur inadäquat mit Immunglobulinen versorgt zu werden (Devillers et al. 2011).

Die Aufnahmemenge von Kolostrum in den ersten 24 Stunden des Lebens hat Auswirkungen auf das Wachstum der Ferkel während der Säugephase und darüber hinaus (Devillers et al. 2011). Wie bereits erwähnt, nehmen LBW-Ferkel weniger Kolostrum auf (Devillers et al. 2007). Auch die Kolostrumaufnahme ist von zahlreichen anderen Faktoren abhängig und tierindividuell sehr variabel (Devillers et al. 2011). Ferkel können bis 585 g (Farmer et al. 2006) bzw. 710 g Kolostrum (Devillers et al. 2011) innerhalb von 24 Stunden aufnehmen. Diese Menge steht im Kontrast zu der von Devillers et al. (2011) errechneten Menge von 300 g, welche mit einem Überleben der neonatalen Periode assoziiert wird. Aktuelle Leitlinien empfehlen, dass ein neugeborenes Ferkel mindestens 200 g Kolostrum aufnehmen sollte, wobei die Immunglobulin-G-Konzentration im Kolostrum über dem Referenzwert von 50 mg/ml liegen sollte (Björkman und Grahofer 2020).

Der Zusammenhang zwischen Kolostrumaufnahme und späteren Wachstumseigenschaften wurde von Declerck et al. (2016) untersucht und diese Untersuchung zeigt, dass besonders das Wachstum von LBW-Ferkeln ($< 0,95$ kg) deutlich von einer erhöhten Kolostrumaufnahme profitiert. Die Autoren¹ der Studie argumentieren, dass eine hohe Kolostrumaufnahme ein Zeichen für eine Dominanz gegenüber anderen Ferkeln im Wettbewerb um die produktiveren cranialen Zitzen ist (Declerck et al. 2016). Durch diese etablierte Hierarchie haben Ferkel mit einer höheren Kolostrum- und Milchaufnahme auch einen bevorzugten Zugang zu den produktiveren cranialen Zitzen während der gesamten Säugephase (Declerck et al. 2016). Somit sind diese besser mit Nährstoffen versorgt und können schneller wachsen. Gleichzeitig mutmaßen Declerck et al. (2016), dass die höheren aufgenommenen Kolostrummengen auch gegen spätere Infektionen schützen könnten. Außerdem profitieren LBW-Ferkel von zusätzlichem Kolostrum mehr, da LBW-Ferkel wegen ihres höheren Körperoberflächen-

¹ Zur besseren Lesbarkeit von Personenbezeichnungen und personenbezogenen Wörtern wird die männliche Form genutzt. Diese Begriffe gelten für alle Geschlechter.

Körpervolumen-Verhältnisses mehr Energie pro Kilogramm Körpermaße benötigen (Declerck et al. 2016).

2.1.4. Bedeutung der Kolostrumaufnahme für die Entwicklung des Dünndarms

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des GIT hat die orale Aufnahme von Nährstoffen (Jensen et al. 2001). Unter physiologischen Bedingungen nehmen Ferkel nach der Geburt Kolostrum auf, welches eine anabole Wirkung auf den gesamten Körper besitzt (Xu 1996; Suárez-Trujillo et al. 2020). In Folge der Kolostrumaufnahme nehmen Länge und Gewicht des Dünndarms in den ersten drei Lebenstagen zu. Außerdem nehmen die Villushöhe, die Kryptentiefe und die Aktivität verschiedener büstensaummembranassoziierter Enzyme zu (Xu et al. 2000). Auch die FPSR wird positiv durch die Kolostrumaufnahme beeinflusst (Burrin et al. 1995). Hierbei spielen sowohl nutritive Faktoren wie AS und Glukose als auch nicht-nutritive Inhaltsstoffe eine Rolle. So enthält porcines Kolostrum zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie Insulin, IGF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und Leptin, welche eine anabole Wirkung auf die intestinale Entwicklung haben (Xu et al. 2000). Auch die im Kolostrum enthaltenen Oligosaccharide haben entscheidende Bedeutung für eine physiologische Darmentwicklung (Jang und Kim 2022). Gleichzeitig resultiert die Gewichtszunahme der intestinalen Mukosa zum Teil aus Endozytose von Makromolekülen, wie Immunglobulinen, die eine lokale Hypertrophie und Hyperplasie der Zellen in der Mukosa bedingen (Xu 1996). Wie zuvor erwähnt, korreliert die aufgenommene Kolostrummenge positiv mit dem Wachstum der Ferkel während und nach der Säugephase (Devillers et al. 2011; Declerck et al. 2016; Suárez-Trujillo et al. 2020). Es ist unklar, ob eine ähnliche Korrelation auch für intestinale Entwicklungsparameter zutrifft oder zusätzliches Kolostrum, welches die überlebensnotwendige Aufnahmemenge von 200 g (Björkman und Grahofer 2020) bzw. 300 g (Devillers et al. 2011) in den ersten 24 Stunden übersteigt, einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Darmentwicklung besitzt, wie dies für neonatale Kälber nachgewiesen wurde (Blättler et al. 2001).

2.1.5. Einfluss des niedrigen Geburtsgewichtes auf das Wachstum von Ferkeln während und nach der Säugephase

Zahlreiche Studien zeigen, dass LBW- und IUGR-Ferkel langsamer wachsen als NBW-Ferkel (Wu et al. 2006; Morise et al. 2008; Huting et al. 2018; Van Ginneken et al. 2022). Es ist unstrittig, dass LBW-Ferkel in der gesamten Aufzucht und Mast leichter sind (Xiong et al. 2020) und einen längeren Zeitraum bis zur Schlachtreife benötigen (Quiniou et al. 2002; Rehfeldt und Kuhn 2006; Schinckel et al. 2010). Jedoch zeigen LBW-Ferkel in Relation zu ihrem

eigenen BW deutlich höhere durchschnittliche Tageszunahmen als NBW-Ferkel (Quiniou et al. 2002). Außerdem muss die Aussage, dass LBW-Ferkel pauschal schlechter wachsen, relativiert werden, da nicht alle LBW-Ferkel den gleichen Phänotyp aufweisen (Hales et al. 2013; Huting et al. 2018). Die Untersuchung von Huting et al. (2018) legt nahe, dass für LBW-Ferkel mit einem hohen BMI und einem höheren relativem BW (individuelles BW / durchschnittliches BW des Wurfes) die Wahrscheinlichkeit höher war, ein normales Wachstumsverhalten zu zeigen als entsprechende LBW-Ferkel mit geringem relativem BW und geringem BMI.

Morise et al. (2008) benennt zudem weitere Ursachen für das geringere Wachstum: Nachteile beim Erreichen der produktiveren kranialen Zitzen auf Grund der geringeren Körpergröße (Lynegaard et al. 2020), eine gestörte Funktionalität des GIT (D'inca et al. 2011) und einen unphysiologischen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus (Nebendahl et al. 2013; Krueger et al. 2014).

Wie zuvor erwähnt, limitiert unabhängig vom Geburtsgewicht die Konkurrenz innerhalb des Wurfes die aufgenommene Kolostrum- und Milchmenge, welche wiederum das Wachstum neonataler Ferkel begrenzt (Hojgaard et al. 2020). Unter Laborbedingungen können Ferkel in den ersten drei Lebenswochen mit einer nährstoffdichteren künstlichen Milch bis durchschnittlich 395 g BW täglich zunehmen (Harrell et al. 1993). Dies entspricht der anderthalbfachen Wachstumsrate, die Ferkel durchschnittlich unter Praxisbedingungen zeigen und legt nahe, dass die Nährstoffdichte der Milch nicht das volle Wachstumspotenzial der Ferkel unterstützt (Farmer et al. 2006).

2.1.6. Die Bedeutung des Geburtsgewichtes für ausgewählte Parameter der neonatalen Entwicklung des porcinen Dünndarms

Ferkel mit niedrigem Geburtsgewicht haben in absoluten Zahlen einen kürzeren und leichteren GIT (Huygelen et al. 2015), da die Größe der inneren Organe zur Geburt linear vom BW abhängig ist (Bauer et al. 1998; Lynegaard et al. 2019). Bei Betrachtung der Organgewichte und Organlängen relativ zum BW besitzen LBW-Ferkel einen größeren/schwereren GIT (Han et al. 2013; Huygelen et al. 2015; Lynegaard et al. 2020). Die histologische Untersuchung des Dünndarms ergab, dass unmittelbar nach der Geburt Unterschiede zwischen Ferkeln mit LBW und NBW bestehen (Everaert et al. 2017). Dies äußert sich durch eine geringere Villushöhe, schmalere Villi, eine geringere Kryptentiefe und eine dünnere Tunica muscularis bei LBW-Ferkeln (Xu et al. 1994; Mickiewicz et al. 2012; Ayuso et al. 2021). Aus der veränderten Morphologie der Villi und Krypten ergibt sich eine geringere Darmoberfläche, woraus auch eine kleinere Absorptionsfläche resultiert (Morise et al. 2008). Diese morphologischen Unterschiede wurden von D'inca et al. (2010) mit einer niedrigeren Expression des

Zellproliferationsmarkers PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) im Ileum von ungesäugten neonatalen IUGR-Ferkeln assoziiert. Die immunhistologischen Untersuchungen von Huygelen et al. (2015) konnten entsprechende Unterschiede hinsichtlich der Zellproliferation im proximalen und distalen Dünndarm bei gesäugten Ferkeln, die 24 Stunden nach der Geburt beprobt wurden, nicht feststellen. Auch bei dem Parameter FPSR im Jejunum wurden sowohl im nüchternen Zustand als auch nach der Fütterung von Kolostrum keine Unterschiede zwischen IUGR- und NBW-Ferkeln beschrieben (Davis et al. 1997). Bei Untersuchungen des Dünndarms älterer Ferkel, welche die ersten 72 Stunden überlebt haben, treten Unterschiede zwischen den Geburtsgewichtgruppen in Hinsicht auf intestinale Parameter weniger deutlich in Erscheinung (D'inca et al. 2010). Gleichzeitig wurde von D'inca et al. (2010) im Ileum fünf Tage alter Tiere auch kein Unterschied hinsichtlich der PCNA-Expression festgestellt. Histologische Untersuchungen zeigen, dass sich die Dünndarmmorphologie der Ferkel mit NBW und LBW ab dem Ende der ersten Lebenswoche kaum noch unterscheidet (Mickiewicz et al. 2012; Huygelen et al. 2015; Wang et al. 2016c). Es sei an dieser Stelle erneut betont, dass die Mortalität von Ferkeln in den ersten drei Tagen nach der Geburt besonders hoch ist und insbesondere LBW-Ferkel verenden (Geiping und Große Beilage 2020). Es ist daher nicht klar, ob LBW-Ferkel, die kurz nach der Geburt beprobt wurden, auch bis zu einer Beprobung zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. zum Absetzen) überlebt hätten (Michiels et al. 2013). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass LBW-Ferkel während ihres gesamten Lebens kleiner und leichter bleiben (Huygelen et al. 2014b; Getty et al. 2015; Huygelen et al. 2015). Es ist jedoch unklar, ob dieser Rückstand hinsichtlich des BW mit persistenten Funktionseinschränkungen des Dünndarms verbunden ist.

2.1.7. Die Entwicklung der Aminosäuretransporter-Abundanz im Jejunum während der Säugephase

Proteine, die mit der Nahrung aufgenommen werden, müssen in einzelne AS oder kurzkettige Peptide gespalten werden, bevor diese durch spezielle Transporter auf den Enterozyten des Dünndarms bzw. bei Jungtieren auch auf den Colonozyten des Colons resorbiert werden (Aschenbach 2022; Buddington et al. 2001). Die Proteinverdauung erfolgt mit der Hilfe von Peptidasen, welche von der Magenschleimhaut, dem Pankreas und der Bürstensaummembran sezerniert werden (Aschenbach 2022). Die Aufnahme von AS bzw. Di- und Tripeptiden erfolgt aktiv durch verschiedene spezialisierte Transporter, wobei spezielle Transporter für neutrale AS (z. B. Alanin, Leucin, Serin), saure AS (Glutamat, Aspartat), basische AS (Arginin, Lysin), Iminosäuren (Prolin) und β -AS (Taurin, β -Alanin) existieren (Bröer und Fairweather 2018; Aschenbach 2022). Insgesamt ist die ontogenetische Entwicklung der Aminosäuretransporter im Jejunum nur schlecht für das Schwein charakterisiert. Jedoch lässt sich ein Entwicklungsmuster erkennen (Buddington 2002). Die

Absorptionsleistung AS relativ zur Gesamtlänge des GIT zu absorbieren, ist zur Geburt der Ferkel am höchsten und nimmt anschließend kontinuierlich während der Säugezeit ab (Buddington et al. 2001). Für die sauren und basischen AS wurde ein ähnliches Entwicklungsmuster beschrieben, wobei die Absorptionsleistung relativ zur Gesamtlänge zwischen dem siebten und dem 42. Lebenstag konstant blieb (Buddington et al. 2001). Während dieser Entwicklungsperiode nimmt die Gesamtlänge sowie die Gesamtoberfläche des GIT zu (Buddington et al. 2001). Diese Entwicklung führt dazu, dass die Kapazität, AS zu absorbieren, in dieser Entwicklungsperiode steigt (Buddington et al. 2001). Dies lässt sich auch durch neuere molekularbiologische Daten exemplarisch für den natriumabhängigen neutralen Aminosäuretransporter 2 (SNAT2) bestätigen (Li et al. 2015).

2.1.8. Die Entwicklung des Aminosäurestoffwechsels im Jejunum während der Säugephase

Im porcinen Dünndarm werden nicht nur aktiv Aminosäuren resorbiert, sondern auch verstoffwechselt, wobei besonders die AS Gln und Glu verstoffwechselt werden (Windmueller 1982). Die Studien von Wang et al. zeigen, dass sich die Abundanz von zahlreichen Proteinen in den Enterozyten des porcinen Jejunums und die Transkript-Abundanz von Proteinen (Wang et al. 2018a), die im Aminosäuremetabolismus involviert sind, zwischen der ersten, der zweiten und der dritten Lebenswoche verändert (Wang et al. 2018a; Wang et al. 2018b). So nimmt etwa die Protein-Abundanz der Glutamat-Dehydrogenase zwischen der ersten und der zweiten bzw. dritten Lebenswoche ab (Wang et al. 2018b). Das Enzym Glutamat-Dehydrogenase wandelt Glu in α -Ketoglutarat um, welches im Citratzyklus weiter verstoffwechselt werden kann (De Buhr 2020). Messungen an porcinen Enterozyten zeigen, dass die Verstoffwechselungsrate von Gln während der Säugezeit abnimmt (Darcy-Vrillon et al. 1994). Jedoch ist insgesamt unklar, ob diese Entwicklung auf Grund der veränderten Zusammensetzung der porcinen Milch oder durch ontogenetische Faktoren bedingt wird (Wang et al. 2018b).

2.1.9. Die Bedeutung der Darmbarriere für die Funktionalität des Darms

Die Hauptfunktion des GIT ist es, Nahrung zu verdauen und die entsprechenden Nährstoffe zu absorbieren (Suzuki 2020). Gleichzeitig muss das Epithel des GIT auch eine Barriere gegenüber der Umwelt schaffen, die einen Übertritt von Pathogenen, Allergenen und Toxinen aus dem Lumen in das umliegende Gewebe verhindert (Degroote et al. 2020). Diese Barriere besteht dabei aus verschiedenen biochemischen und physikalischen Komponenten, deren komplexe Interaktion die Funktionalität der Darmbarriere gewährleistet (Suzuki 2020). Entscheidend für die Funktionalität der Darmbarriere sind hierbei die Tight Junction-Proteine

(TJP), die eine Verbindung zwischen den einzelnen Zellen des Darmepithels ermöglichen (Suzuki 2020). Tight Junction-Proteine bilden zwischen den unterschiedlichen Epithelzellen des Dünndarms eine semipermeable Barriere, die unerlässlich für eine physiologische Darmfunktion ist (Moeser et al. 2017). Somit wird die parazelluläre Permeabilität der Darmbarriere hauptsächlich von TJP reguliert (Moeser et al. 2017; Skrzypek et al. 2018). Prominente Vertreter dieser Gruppe sind Occludin, die Gruppe der Claudine und die Gruppe der Zona-Occludens-Proteine (ZO) (Moeser et al. 2017). Ergänzt werden diese Bestandteile der Darmbarriere durch eine Mucusschicht, die von den Becherzellen des Darms produziert wird (Vancamelbeke und Vermeire 2017). Diese Mucusschicht schützt das darunter liegende Epithel vor mechanischen, chemischen und bakteriellen Noxen (Święch et al. 2022).

Die Permeabilität der Darmbarriere ist jedoch nicht ausschließlich von den TJP abhängig, sondern auch von den zellulären Komponenten der Darmbarriere (Skrzypek et al. 2018). Hierbei nehmen die Enterozyten eine besondere Rolle ein. Einige Enterozyten neonataler Ferkel besitzen große Vakuolen in ihrem Zytoplasma. Diese Zellfraktionen werden auch als fetale Enterozyten bezeichnet und werden ab dem 110. Trächtigkeitstag im porcinen fetalen Dünndarm nachgewiesen (Dekaney et al. 1997). Die fetalen Enterozyten neonataler Ferkel besitzen die Fähigkeit Makromoleküle zu absorbieren und entweder direkt zur zentralen Zirkulation zu transportieren oder die Makromoleküle mit Hilfe von Lysosomen zu verdauen (Skrzypek et al. 2018). Die Fähigkeit, Makromoleküle zu absorbieren, verschwindet spätestens 48 Stunden nach der Geburt und wird als Schluss der Darmschranke bezeichnet (Skrzypek et al. 2007). Unter physiologischen Bedingungen verschwinden die fetalen Enterozyten zuerst in den cranialen Bereichen des Dünndarms bis etwa zum dritten Lebenstag. In den weiter distal gelegenen Abschnitten werden fetale Enterozyten auch noch in der dritten Lebenswoche nachgewiesen (Skrzypek et al. 2007).

Die Funktionsfähigkeit der Darmbarriere kann durch verschiedene Methoden gemessen werden. Diese Messungen können *in vivo* (Lactulose-Mannitol-Test), *ex vivo* (Ussing-Kammer) und *in vitro* erfolgen (Vancamelbeke und Vermeire 2017). Das Prinzip dieser Messungen und entsprechende Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden wurden bereits in einer Übersichtsarbeit prägnant zusammengefasst (Vancamelbeke und Vermeire 2017). Zusätzlich kann die Anzahl von TJP auf Protein- und mRNA- (**Messenger RNA**) Ebene bestimmt werden. Zudem können TJP mit Hilfe von Immunhistochemie (**IHC**) lokalisiert werden (Vancamelbeke und Vermeire 2017). Diese molekularbiologischen Methoden ermöglichen es, Mechanismen hinter den Permeabilitätsstörungen zu erklären. Die isolierte Anwendung der einzelnen molekularbiologischen Methoden lässt jedoch keine Aussage über den Funktionsstatus der Darmbarriere zu (Vancamelbeke und Vermeire 2017).

Störungen der Darmbarriere werden beim Menschen mit chronisch entzündlichen Darm-Erkrankungen, wie Morbus Crohn sowie ulcerativer Colitis, in Verbindung gebracht und gehen einher mit erhöhter intestinaler Permeabilität und veränderter TJP-Expression (Vancamelbeke und Vermeire 2017). Infektionen mit enterotoxischen *E. coli* (ETEC) können bei Schweinen sekretorische Diarrhoe auslösen (Jacobson 2022). Ein weiterer Pathomechanismus ausgewählter *E. coli* Serovare ist die Sezernierung von Toxinen, welche mit verschiedenen TJP interagieren und somit die Funktionalität der Darmbarriere stören (Ngendahayo Mukiza und Dubreuil 2013).

2.1.10. Auswirkungen eines niedrigen Geburtsgewichtes auf die Funktionalität der Darmbarriere

Mehrere Studien beschäftigten sich bereits mit den Auswirkungen von LBW und IUGR auf die Funktionalität der Darmbarriere (Huygelen et al. 2014a; Wang et al. 2016c; Olszewski et al. 2021). Ein niedriges Geburtsgewicht steht ebenfalls bei ungesäugten Ferkeln mit einer höheren parazellulären und transzellulären Permeabilität sowohl im proximalen als auch im distalen Dünndarm in Verbindung (Wang et al. 2016c). Gleichzeitig wies die Arbeitsgruppe von Wang et al. (2016c) im proximalen Dünndarm der gleichen Tiere eine geringere Menge des TJP Occludin auf mRNA- und Protein-Ebene als bei NBW-Wurfgeschwistern nach. Auch andere Arbeitsgruppen wiesen geringere Mengen von TJP im Dünndarm von Ferkeln mit IUGR oder LBW nach. Die Studie von Zhu et al. (2017) zeigt, dass die Abundanz unterschiedlicher TJP, einschließlich der von Occludin, im Jejunum fetaler Ferkel mit LBW signifikant geringer als bei Feten mit NBW war.

Eine höhere Anzahl an fetalen Enterozyten im distalen Jejunum und im Ileum wurde von Ferenc et al. (2017) bei sieben Tage alten Ferkeln mit IUGR nachgewiesen. Die höhere Anzahl von fetalen Enterozyten im Dünndarm neonataler Ferkel wird von Skrzypek et al. (2018) mit einer geringeren Menge an aufgenommenem Kolostrum assoziiert. Gleichzeitig zeigt die Studie von Ferenc et al. (2017) Unterschiede in der Abundanz von Proteinen des enteralen Kohlenhydratstoffwechsels, der Apoptose und der Zellstruktur. In dieser Studie wurde gezeigt, dass u. a. die Proteinabundanz von Hexokinase I im Jejunum von IUGR-Ferkeln geringer war als bei NBW-Kontrolltieren. Außerdem wies die gleiche Arbeitsgruppe nach, dass sich vermehrt intraepitheliale Leukozyten sowie mehr fetale Enterozyten im proximalen Dünndarm von sieben Tage alten Ferkeln mit IUGR befanden (Olszewski et al. 2021). Obwohl keine Permeabilitätsmessungen durchgeführt wurden, assoziieren Olszewski et al. (2021) diese Veränderungen mit einer höheren intestinalen Permeabilität und daraus folgend eine höhere Translokation von Bakterien und anderen Pathogenen aus dem Darmlumen in das intestinale Gewebe (Everaert et al. 2017). Der Transfer von Antigenen wird wiederum in Verbindung mit

einer höheren mRNA-Abundanz von proinflammatorischen Cytokinen, wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, gebracht (Wang et al. 2016c; Villagómez Estrada et al. 2022). Entsprechende mRNA-Abundanzen wurden mittels des Verfahrens der reversen quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion bestimmt.

Hingegen fanden Huygelen et al. (2014a) keine Unterschiede bei gesäugten Ferkeln mit LBW oder NBW, die 24 Stunden nach der Geburt beprobt wurden, hinsichtlich der Darmpermeabilität und der Occludin-Abundanz im Dünndarm dieser Tiere. Eine erhöhte Permeabilität wird mit einem höheren Grad oxidativen Stresses assoziiert (Wang et al. 2016c). Eine Methode zur Quantifizierung des oxidativen Stresses ist die Bestimmung des Verhältnisses von GSH (reduzierter Status) zu oxidiertem Glutathion-Disulfid (**GSSG**) in entsprechendem Gewebe (Rasch et al. 2019a).

Bei Ferkeln, die älter als drei Tage sind, konnten hinsichtlich der Permeabilität der Darmbarriere kaum Unterschiede festgestellt werden (Huygelen et al. 2015; Wang et al. 2016c). Es ist unklar, in welchem Umfang die Darmbarriere von LBW-Ferkeln während der weiteren Säugephase beeinträchtigt ist. Unterschiede hinsichtlich der intestinalen Permeabilität werden auch mit einer geringeren Kolostrumaufnahme assoziiert (De Vos et al. 2014a; Ferenc et al. 2017). Die Aufnahme von bovinem Kolostrum hat einen positiven Einfluss auf die Darmbarriere und die Expression einzelner TJP von Saugferkeln (De Vos et al. 2014b). Ursächlich hierfür könnte laut den Autoren der Studie die AS Gln sein, die in hohen Konzentrationen im Kolostrum verschiedener Spezies zu finden ist (De Vos et al. 2014b). Die Übersichtsarbeit von Wu (2010) stellt dar, dass einzelne AS positive Eigenschaften auf das Wachstum und die Darmentwicklung haben könnten und der Autor sieht in der Supplementierung einzelner AS eine Möglichkeit, das Wachstum und die Darmgesundheit von Ferkeln zu verbessern. Dabei bezieht sich das Postulat nicht nur auf Gln, sondern auch auf die AS Arginin (**Arg**) (Wu et al. 2018).

2.2. Fütterungsstrategien basierend auf einzelnen Aminosäuren zur Verbesserung des Wachstums und der Darmentwicklung neonataler Ferkel

Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben sich darauf konzentriert die Gesundheit und die Entwicklung des porcinen GIT durch Supplementierung des Futters mit kristallinen AS zu verbessern (Chalvon-Demersay et al. 2021; Luise et al. 2023). Im GIT werden sowohl AS absorbiert und verstoffwechselt als auch synthetisiert. Alle diese Funktionen sind für ein optimales Wachstum von Schweinen unerlässlich (Wu 2010). In ihrer Übersichtsarbeit verglichen Chalvon-Demersay et al. (2021) insgesamt 163 Studien, die sich mit den Effekten von einzelnen AS auf die Darmbarriere, die Verdauungskapazität, die antioxidative Abwehr, das Immunsystem oder die mikrobielle Besiedlung des GIT von Schweinen beschäftigten. Dabei benennt dieser Review für 14 der 20 proteinogenen AS einen positiven Effekt auf zuvor genannte Parameter. Die Übersichtsarbeit von Chalvon-Demersay beschäftigt sich jedoch fast ausschließlich mit der Supplementierung bei Absatzferkeln. Im Vergleich dazu wurde die Wirkung einzelner supplementierter AS auf die intestinale Entwicklung von Saugferkeln bisher nur wenig untersucht (Huting et al. 2021). Die Annahme, dass die porcine Milch in ihrem Aminosäuremuster optimal für das Wachstum von Ferkeln sei, wird von einzelnen Arbeitsgruppen angezweifelt (Wu 2009; Wu et al. 2018).

Studien zeigten, dass Saugferkel, wenn diese zusätzlich mit einem nährstoffdichten, flüssigem Prestarter versorgt werden (De Greeff et al. 2016) oder mit einer nährstoffdichteren Diät versorgt werden (Harrell et al. 1993), besser wachsen und eine schnellere Darmentwicklung aufweisen als Ferkel, die nur von ihren entsprechenden Muttersauen gesäugt wurden. Verschiedene Studien haben sich auch bei Saugferkeln mit der Supplementierung von einzelnen kristallinen AS beschäftigt, um das Wachstum der Ferkel zu optimieren (Wu et al. 2011; Getty et al. 2015; Yonke et al. 2023). Weiterhin hat ein Großteil der Studien das Ziel, die Entwicklung des GIT zu beschleunigen, damit die Futterumstellung, welche durch das Absetzen stattfindet, optimal verkraftet wird (Huting et al. 2021). Hierzu wurden Untersuchungen zur Supplementierung einzelner AS bei Saugferkeln durchgeführt. Die Ferkel wurden in den Studien durch verschiedene Verfahren mit AS supplementiert. Hierzu zählen direkte Supplementierung (Haynes et al. 2009), supplementierte Milchaustauscher (Kim und Wu 2004), supplementiertes Beifutter (Cabrera et al. 2013) und eine indirekte Supplementierung über das Futter der Sauen (Wessels et al. 2023). Hierbei wurden vor allem die AS Arg, Prolin (**Pro**) und Leucin (**Leu**) untersucht.

2.2.1. Arginin-Supplementierung

Auf Grund von früheren Studien wurde die Hypothese formuliert, dass sich die neonatale Arg-Synthese in der Lokalisation der Synthese und den präferierten Edukten von adulten Tieren unterscheidet (Bertolo und Burrin 2008). Es wurde angenommen, dass bei neugeborenen Tieren die Arg-Synthese vor allem im Darm und nicht in der Niere stattfindet (Bertolo und Burrin 2008). Jedoch zeigen neuere Studien, dass auch bei neugeborenen Ferkeln Arg in der Niere aus der AS Citrullin synthetisiert wird (Marini et al. 2017). Der Hauptort der Citrullin-Synthese sind Enterozyten und Hepatozyten, wobei u. a. Arg, Glu und Pro als Edukte dienen (Marini et al. 2017). In der Leber synthetisiertes Citrullin wird unter physiologischen Bedingungen nicht dem Gesamtorganismus zugeführt, sondern im Harnstoffzyklus verstoffwechselt (Marini et al. 2017). Im Darm synthetisiertes Citrullin wird dem Körperkreislauf zugeführt und gelangt über die *Arteria renalis* in die Niere, wo es sowohl bei neonatalen Saugferkeln als auch bei Absatzferkeln zu Arg verstoffwechselt wird und wiederum über die *Vena renalis* an den Gesamtorganismus abgegeben wird (Marini et al. 2017).

Die für neonatale Ferkel essentielle AS Arg (Brunton et al. 1999) liegt nach Wu et al. (2018) in der Milch nicht in ausreichender Menge für ein optimales Wachstum von Saugferkeln vor. Unter gewissen experimentellen Bedingungen erwies sich eine Arg-Supplementierung bei Saugferkeln als erfolgreich. Bei Ferkeln, die zwischen dem siebten und dem 21. Lebenstag mit einem Milchaustauscher versorgt wurden, bewirkte eine Arg-Zulage von 0,2 % ein 15 % höheres BW und eine Zulage von 0,4 % ein 32 % höheres BW gegenüber isonitrogen gefütterten Kontrolltieren (Kim und Wu 2004). Die Studie von Yang et al. (2016b) untersuchte ebenfalls die Auswirkungen einer Arg-Supplementierung auf die Entwicklung von Saugferkeln. In den drei untersuchten Gruppen erhielten Ferkel zwischen dem vierten und dem 21. Lebenstag eine der drei isonitrogenen Diäten in Form von Milchaustauschern, die entweder 0,4 % Arg, 0,8% Arg oder eine isonitrogene Menge an Alanin (**Ala**) erhielten. Durch die Arg-supplementierten Diäten wurden positive Effekte auf das Wachstum vor dem Absetzen festgestellt, wobei auch nach dem Absetzen das BW der Arg-supplementierten Tiere höher war (Yang et al. 2016b). Außerdem hatte eine Arg-Supplementierung positive Effekte auf die Morphologie in Form von längeren Zotten und tieferen Krypten im Duodenum, Jejunum und Ileum (Yang et al. 2016b).

Bei Ferkeln mit IUGR hatte ein mit Arg supplementierter Milchaustauscher einen positiven Effekt auf das Wachstum, die Inzidenz von Diarrhoe sowie zahlreiche intestinale Parameter, einschließlich der jejunalen Morphologie und der Zellproliferation, im Vergleich zu isonitrogen gefütterten Tieren (Wang et al. 2012). Zu einem gegenteiligen Ergebnis kam die Studie von Getty et al. (2015). Diese Studie befasste sich mit einer Arg-Supplementierung bei Ferkeln mit NBW sowie LBW, die ausschließlich von ihrer Muttersau gesäugt wurden und entweder Arg

oder eine isonitrogene Menge an Ala erhielten. Sowohl Arg-supplementierte LBW-Ferkel als auch Arg-supplementierte NBW-Ferkel zeigten eine geringere Körpergewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die eine isonitrogene Ala-Supplementierung erhielten. Gleichzeitig verweisen die Autoren darauf, dass die Studie unter konventionellen Haltungsbedingungen durchgeführt wurde und in der Regel Schwankungen im Aminosäuremuster der porcinen Milch nicht berücksichtigt werden. Die Autoren geben zudem zu bedenken, dass in ihrer Arbeit beschriebene Wachstumsdepression auf Grund von Imbalancen im Muster der aufgenommenen AS entstanden sein könnten (Getty et al. 2015). Für Wu et al. (2018) ist das verschlechterte Wachstum der Ferkel in der Studie von Getty et al. (2015) das Resultat eines suboptimalen Verhältnisses von Arg zu Lysin (**Lys**) und verweist auf die Arbeit von Wilkinson et al. (2004), welche zeigt, dass ein unausgeglichenes Arg-Lys-Verhältnis mit einem herabgesetzten Wachstum verbunden ist. Weiterhin sind Wu et al. (2004) der Meinung, dass eine Arg-Supplementierung durch die ausschließliche Verfütterung eines Milchaustauschers, wie von Kim und Wu (2004) durchgeführt, unter ökonomischen Gesichtspunkten unrentabel sei.

2.2.2. Prolin-Supplementierung

Auch für die nicht essentielle AS Pro wurden positive Effekte auf das Wachstum beobachtet. So hatte eine neonatale Supplementierung von Pro bei Saugferkeln einen positiven Effekt bis zum 17. Lebenstag auf das Wachstum, die intestinale Abundanz von TJP und die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe, die eine nicht-isonitrogene und nicht-isokalorische Kontrolldiät erhielten (Wang et al. 2015b). Weiterhin gibt es Hinweise, dass es sich bei Pro um eine für Ferkel essentielle AS handelt (Ball et al. 1986).

2.2.3. Leucin-Supplementierung

Ebenfalls positive Effekte wurden bei der Supplementierung der essentiellen Aminosäure Leu (tägliche Dosis 1,4 g/kg BW) beobachtet. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die eine isonitrogene Menge Ala erhielt, verbesserte eine Leu-Supplementierung während der ersten 21 Lebenstage das Wachstum von Saugferkeln, die ausschließlich vom eigenen Muttertier gesäugt wurden (Sun et al. 2015). Gleichzeitig besaßen die Ferkel der gleichen Studie längere Villi im Duodenum und Ileum sowie eine höhere Expressionsrate zahlreicher Aminosäuretransporter im Jejunum. Die Leu-Konzentration in der porcinen Milch ist laut den Autoren der Studie für eine optimale Entwicklung des Dünndarms sowie des Gesamtorganismus nicht ausreichend (Sun et al. 2015). Gleichzeitig führte die gewählte Supplementierung zu keinen Imbalancen im Aminosäurestoffwechsel (Sun et al. 2015). Jedoch zeigt eine andere Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe, dass eine Leu-Supplementierung

(tägliche Dosis 0,7; 1,4; 2,1 g/kg BW) auch negative Effekte auf das Wachstum von neonatalen IUGR-Ferkeln haben kann (Ji et al. 2022). Außerdem war eine Leu-Supplementierung in dieser Studie mit einer geringeren Abundanz verschiedener Aminosäuretransportern und eine reduzierten Konzentration verschiedener AS im Plasma assoziiert (Ji et al. 2022). Andererseits legen die Publikationen aus der Arbeitsgruppe von Teresa Davis nahe, dass Leu eine insulinunabhängige Wirkung auf die FPSR im Skelettmuskel hat und so das Potenzial hat, das Wachstum von Ferkeln zu verbessern (Posey und Davis 2023).

2.2.4. Glutaminsäure-Supplementierung

Auch die Supplementierung von Saugferkeln mit AS, die sowohl in proteingebundener als auch in ungebundener Form in hohen Konzentrationen in der Milch quantifiziert wurden, wurde untersucht (Haynes et al. 2009). Glutamat wird zu einem Großteil im Dünndarm direkt metabolisiert und gilt als eine Hauptenergiequelle der Enterozyten des Dünndarms (Stoll und Burrin 2006). Eine Supplementierung mit Mononatriumglutamat führte allerdings in keiner der getesteten Konzentration zu einer signifikanten Verbesserung des Wachstums der Saugferkel im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zhang et al. 2013). Jedoch führte eine Supplementierung mit Mononatriumglutamat zu einer erhöhten Expression verschiedener Glutamatrezeptoren sowie verschiedener Aminosäuretransporter sowohl im Magen als auch im Jejunum (Zhang et al. 2013). Ein verbessertes Wachstum, eine geringere oxidative Belastung des jejunalen Gewebes und ausgereifere jejunale Morphologie wurde in abgesetzten Ferkeln nachgewiesen, deren Futter mit Mononatriumglutamat supplementiert wurde (Rezaei et al. 2013). Außerdem wurde eine erhöhte Expression von TJP im jejunalen Gewebe bei abgesetzten Ferkeln in Folge einer Glu-Supplementierung nachgewiesen (Lin et al. 2014). Ähnliche Effekte wurden auch über die Supplementierung von abgesetzten Ferkeln mit der AS Gln, die strukturell Glu stark ähnelt, publiziert (Ji et al. 2019).

2.3. Die Bedeutung von Glutamin für die porcine Ernährung

Chemisch betrachtet sind die Strukturen von Gln und Glu sehr ähnlich (Branitzki-Heinemann 2020) (Vergleich Abbildung 2.3). Im Gegensatz zu Glu, welches insgesamt zwei Carboxygruppen besitzt, enthält die AS Gln zwei Aminogruppen (Branitzki-Heinemann 2020).

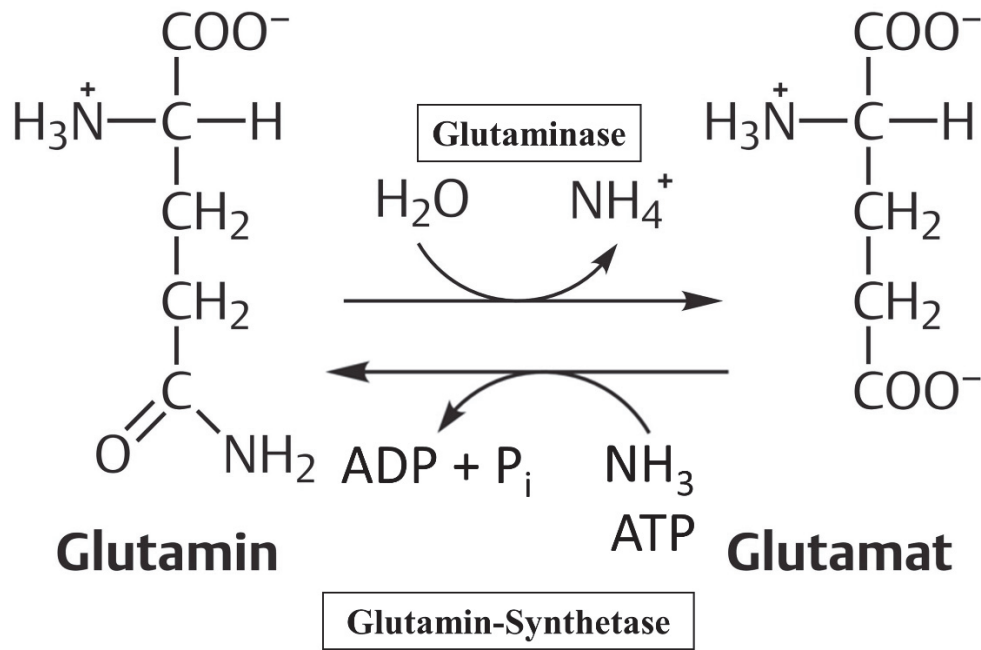


Abbildung 2.1 Vergleichende Darstellung der Strukturformeln von Glutamat und Glutamin sowie schematische Darstellung der Glutaminsynthese und der Glutaminhydrolyse bei einem physiologischen pH-Wert (pH 7,4) (adaptiert nach Branitzki-Heinemann 2020)

Die Konzentration beider AS ist in der porcinen Milch sowohl proteingebunden (4,95-12,75 g/L) als auch ungebunden (2,54-99,84 mg/L) hoch (Davis et al. 1994; Haynes et al. 2009; Li et al. 2022). Oral aufgenommenes Gln wird in einem großen Umfang in den Enterozyten des Dünndarms zu Glu verstoffwechselt (Stoll und Burrin 2006). Die entsprechende Hydrolyse findet abhängig vom Enzym Glutaminase in den Enterozyten des Dünndarms statt (Cruzat et al. 2018), indem Gln in Glu und ein Ammoniummolekül gespalten wird. Die umgekehrte Reaktion wird durch das Enzym Glutaminsynthetase katalysiert und ist ATP-abhängig. Die Skelettmuskulatur ist das prozentual wichtigste Gewebe der endogenen Glutaminsynthese (Cruzat et al. 2018).

Unter sauren Bedingungen, wie sie bei der sauren Hydrolyse von Proteinen angewendet werden, wird Gln auch zu Glu hydrolysiert. Dadurch ist es nicht möglich proteingebundenes Gln, z. B. aus dem Milchprotein Casein, von proteingebundenem Glu zu unterscheiden, wenn Proteine unter sauren Bedingungen (6 mol/L HCL bei 110° C für 24 Stunden) hydrolysiert werden (Wu und Knabe 1994). Historisch gesehen war es deshalb lange nicht möglich,

proteingebundenes Gln zu quantifizieren (Tsao und Otter 1999). Erst die von Tsao und Otter (1999) entwickelte enzymatische Hydrolyse ermöglichte die Quantifizierung von proteingebundenem Gln in Milch und in verschiedenen Geweben. Dies ist von besonderem Interesse, da im porcinen Kolostrum nur etwa 0,1 Prozent des Gln ungebunden vorliegen und auch in der Milch am achten Tag der Laktation nur etwa 4 % des Gln als freie AS vorliegen (Haynes et al. 2009). Glutamin und Glu sind gemeinsam quantitativ zwei bedeutende AS im porcinen Kolostrum und in der porcinen Milch (Farmer 2014). *In-vitro*-Studien zeigen, dass die CO₂-Produktion aus Gln in Enterozyten von zwei Tage alten Ferkeln vierfach höher ist im Vergleich zu Glukose. Somit ist Gln ein wichtiger Energielieferant für porcine Enterozyten (Posho et al. 1994). Gleichzeitig zeigt diese Studie auch, dass weitere Metabolite im intestinalen Gln-Stoffwechsel entstehen, z. B.: Lactat, Pyruvat, Ala, Ammoniak, Glu und Aspartat. Somit ist Gln auch über seinen Metabolit Glu eine potentielle Präkursorkomponente für das wichtige Antioxidans GSH (Wang et al. 2008).

Zudem haben sich verschiedene Studien mit den Auswirkungen variabler Gln-Konzentrationen in Nährmedien porciner intestinaler Zelllinien auseinandergesetzt (Kim und Kim 2017). In Gln-angereicherten Nährmedien stieg die Abundanz von zahlreichen TJP in porcinen Enterozyten-Kulturen und verringerten die parazelluläre Permeabilität (Wang et al. 2016a; Zhang et al. 2023). Zudem wurden auch die antioxidativen Eigenschaften von Gln in porcinen Zellkulturen nachgewiesen (Haynes et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von verschiedenen Autoren bei abgesetzten Ferkeln beobachtet (Ji et al. 2019; Luise et al. 2023)

2.3.1. Effekte einer Glutamin-Supplementierung bei abgesetzten Ferkeln auf Wachstum, antioxidativen Stoffwechsel und Integrität der Darmbarriere

Zahlreiche Studien haben sich mit den Effekten einer Gln-Supplementierung bei abgesetzten Ferkeln auf ausgewählte Parameter der Darmentwicklung auseinandergesetzt. Entsprechende Ergebnisse wurden in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst (Ji et al. 2019) und zur gleichen Thematik wurde bereits eine Metastudie veröffentlicht (Luise et al. 2023). Diese Metastudie kommt zum Ergebnis, dass eine Supplementierung mit Gln weder zu einer verbesserten Futteraufnahme noch zu höheren täglichen Zunahmen führt. Jedoch kommt diese Studie zu der Schlussfolgerung, dass eine Supplementierung mit Gln mit einem größeren Verhältnis von Villushöhe zu Kryptentiefe in Duodenum und Jejunum assoziiert ist. Gleichzeitig zeigt diese Metaanalyse auch, dass eine Supplementierung von Gln bei Absatzferkeln im Großteil der Studien zu einer erhöhten Proteinabundanz von Occludin im Jejunum führt, jedoch nicht zu einer erhöhten Proteinabundanz verschiedener Interleukine. Die Supplementierung ist auch nicht mit einer erhöhten Aktivität von Lactase, Sacharase und Lactase verbunden (Luise et al. 2023). Auch außerhalb der beschriebenen Metaanalyse

wurden verschiedene Studien zur Gln-Supplementierung bei Absetzferkeln durchgeführt. Bei abgesetzten Ferkeln hat eine Gln-Supplementierung positive Einflüsse auf die Leukozytenanzahl im Blut nach einer intraperitonealen Lipopolysaccharid Applikation (Yoo et al. 1997). Während experimentellen *Escherichia-Coli*-Infektionen wurde ein positiver Effekt von Gln auf die intestinale Permeabilität nachgewiesen (Ewaschuk et al. 2011). Die parazelluläre Permeabilität im Jejunum von 28 Tage alten abgesetzten Ferkeln war ebenfalls geringer, wenn die Diät dieser Tiere zusätzliches Gln enthielt (Wang et al. 2015a). Gleichzeitig unterschieden sich die Gln-supplementierten Absatzferkel von den Absatzferkeln, die eine isonitrogene Menge Ala erhielten, darin, dass die Proteinabundanz zahlreicher TJP höher war (Wang et al. 2015a). Erkenntnisse zum Einfluss von Gln auf die Abundanz von TJP im Jejunum von Saugferkeln wurden bisher noch nicht publiziert.

In einer weiteren Studie wurde die antioxidativen Effekte von Gln auf die GSH-Konzentration und den entsprechenden Oxidationsstatus von GSH im Gewebe des Jejunums abgesetzter Ferkel nachgewiesen (Wang et al. 2008). Es zeigte sich auch, dass abgesetzte Ferkel, im Vergleich zu gleichalten säugenden Ferkeln, höherem oxidativem Stress ausgesetzt waren (Wang et al. 2008). Ferkel mit IUGR sind direkt nach ihrer Geburt auch erhöhtem oxidativem Stress im Jejunum ausgesetzt (Wang et al. 2016c). Es ist bisher aber unklar, ob zusätzliches Gln diesen oxidativen Stress bei Saugferkeln lindern kann.



2.3.2. Glutamin-Supplementierung bei Saugferkeln

Im Vergleich zu Absetzferkeln sind die Effekte einer Gln-Supplementierung bei Saugferkeln weniger gut erforscht. Trotz der hohen Mengen an Gln in der Milch postulieren Wu et al. (2011), dass die Menge an Gln nicht ausreichend für das optimale Wachstum von Ferkeln sei. Die in der Übersichtsarbeit von Wu et al. (2011) veröffentlichten Primärdaten zeigen, dass Ferkel mit IUGR höhere Tageszunahmen besitzen und eine geringere Mortalitätsrate aufweisen, wenn sie während der Säugezeit zweimal täglich mit jeweils 0,5 g/kg BW Gln supplementiert werden. Auch die Studie von Haynes et al. (2009) untersuchte die Effekte einer Supplementierung von Gln und des Dipeptides L-Alanyl-L-Gln an Saugferkeln zwischen dem siebten und dem 21. Lebenstag. Gleichzeitig erhielten die Ferkel an ihrem 14. Lebenstag eine intraperitoneale Injektion mit bakteriellem Lipopolysaccharid. Die Gln-supplementierten Ferkel wiesen während des gesamten Versuches höhere Tageszunahmen auf, hatten eine geringere Rektaltemperatur nach der Injektion von bakteriellem Lipopolysaccharid und einer größere Villushöhe im Jejunum im Vergleich zu den isonitrogen gefütterten Kontrolltieren (Haynes et al. 2009). In weiteren Studien wurden die Effekte einer maternalen Gln-Supplementierung auf das Wachstum und Parameter der Darmentwicklung der zugehörigen Ferkel untersucht, wobei die einzelnen Studien kein einheitliches Ergebnis zu diesen Parametern wiedergeben (Kitt

2004; Manso et al. 2012; Yang et al. 2018; Wessels et al. 2023). Eine weitere Möglichkeit, Gln zu supplementieren, ist die Gln-Supplementierung über das Beifutter. Hier zeigen Studien geringe bis keine Effekte einer Gln-Supplementierung auf das Wachstum von Saugferkeln und Parameter der Darmentwicklung (Cabrera et al. 2013; Hanczakowska und Niwinska 2013; Hanczakowska 2014).

Insgesamt ist unklar, ob eine Gln-Supplementierung positive Effekte auf die Entwicklung des Dünndarms während der Säugephase besitzt. Die Studie von Bertolo et al. (1999) zeigt, dass ein Gln-freier Milchaustauscher, im Vergleich zu einer Gln-angereicherten Diät, weder negative noch positive Effekte auf das Wachstum und die intestinale Entwicklung von Ferkeln hat. Die Autoren dieser Studie betonen, dass möglicherweise Gln nur unter belastenden Bedingungen einen positiven Einfluss auf die Darmentwicklung haben könnte. Aus bisher veröffentlichter Literatur ist es nicht eindeutig möglich einzuschätzen, ob eine Gln-Supplementierung die Entwicklung des Dünndarms, einschließlich der Abundanz von TJP, neonataler Ferkel kurzfristig oder auch persistent verbessern könnte.

3. Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

Johannes Schregel¹ , Johannes Schulze Holthausen² , Quentin L. Sciascia¹, Zeyang Li¹, Solvig Görs¹, Anja Eggert³, Armin Tuchscherer³, Jürgen Zentek², Cornelia C. Metges^{1*}

¹ Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute of Nutritional Physiology, Dummerstorf, Germany

² Freie Universität Berlin, Department of Veterinary Medicine, Institute of Animal Nutrition, Berlin, Germany

³ Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute for Genetic and Biometry, Dummerstorf, Germany

 These authors contributed equally to this work

Manuscript Received: 30.11.2021

Accepted: 06.04.2022

Published: 27.04.2022

*Corresponding author: metges@fbn-dummerstorf.de

Dieses Kapitel wurde veröffentlicht in:

PLoS ONE 17(4): e0267357

DOI: [10.1371/journal.pone.0267357](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267357)

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abbreviations: AA, Amino Acid; Aad, α -Aminoadipic acid; Ala, Alanine; BiW, Birth weight; CD, Crypt depth; FAA, Free amino acids; FPSR, Fractional protein synthesis rate; Gln, Glutamine; LBW, Low birth weight; LSM, Least squares means; NBW, Normal birth weight; PBAA, Protein-bound amino acids; SE, Standard error; SI, Small intestine; Suppl, supplementation group; TAA, Total amino acids; TuM, Tunica muscularis thickness; VH, Villus height; VW, Villus width

3.1. Abstract

3.1.1. Background

It has been shown that small intestine development in low birth weight (LBW) piglets is impaired. Glutamine (Gln) has been reported to improve piglet health and intestinal function in weaned piglets, but data is scarce in suckling piglets. This study was conducted to investigate the effects of oral Gln supplementation compared to Alanine (Ala) on jejunal development and function in 5 and 12 d old male LBW and normal birth weight (NBW) suckling piglets.

3.1.2. Results

Gln had no effect on the jejunal morphology, development, tissue and digesta amino acid profiles and mRNA abundance of genes involved in amino acid transport, metabolism, glutathione synthesis in LBW piglets when compared to Ala supplementation and birth weight controls at 5 and 12 d. Only the concentration of Gln in jejunal tissue was higher in NBW piglets supplemented with Gln compared to Ala at 5 d ($P < 0.05$). A comparison of the birth weight groups showed no differences between LBW and NBW piglets at 5 and 12 d in any parameter. Jejunal crypt depth, villus height / width, tunica muscularis thickness, number of goblet and IgA positive cells, the ratio of jejunal RNA to DNA and the concentration of DNA, protein and RNA changed ($P < 0.05$) from 5 compared to 12 d. The concentrations of several free, and protein bound amino acids as well as amino metabolites differed between age groups in jejunal tissue but the digesta concentrations were affected to a lesser extent.

3.1.3. Conclusions

Oral Gln supplementation to suckling male piglets over the first 12 d of life was not associated with changes in jejunal parameters measured in this study. The absence of effects may indicate that Gln is absorbed as well as metabolized in the upper intestinal tract and thus could benefit intestinal development at a more proximal location.

3.2. Introduction

Increasing litter sizes in modern pig production have led to higher numbers of LBW piglets [1]. Low birth weight is accompanied by an increased risk of disease, impaired organ development, and higher mortality [2–4]. In terms of animal welfare, the high rate of mortality in LBW piglets, especially in male piglets [5], is ethically debated [6] and results in significant economic losses [7]. The pig is additionally interesting because it is considered as an excellent animal model

for human nutrition [8]. Underweight infants often have problems related to immature development of the intestinal tract [9].

The small intestine (SI) has digestive, absorptive as well as immunological functions and grows rapidly in the early neonatal period [10]. This rapid growth is fueled by colostrum and milk intake, which provides not only energy and essential nutrients, but also different bioactive compounds such as growth hormones [11]. The jejunum is the largest section of SI [12] and during the neonatal period the morphology, several metabolic pathways and immunological functions are constantly changing [13–15]. Previous studies in piglets show that jejunal morphology, development and function is impaired in LBW individuals [16–18]. To overcome this impairment several nutritional strategies have been developed [1, 19]. These include supplementations with colostrum [20] or bovine whey protein [21], nucleotides [22], short-chain fatty acids [23] and specific amino acids (AA) [24].

Glutamine (Gln) and glutamate (Glu) are the most abundant protein bound amino acids (PBAA), whereas free glutamine in sow milk increases during lactation and becomes the most abundant free amino acid (FAA) [25]. In vitro studies have shown that Gln is a primary energy source for neonatal porcine enterocytes [26–28]. It is assumed that Gln promotes protein synthesis, immune response and oxidative status in mucosal cells of SI [29]. In enterocytes, Gln can be transformed to Glu, which is a precursor of glutathione, a key anti-oxidative defense molecule [30]. Gln metabolism by the jejunum has been investigated in several species, including pigs [27, 31, 32]. However, the majority of the Gln supplementation studies in pigs have been conducted in weaned piglets [29, 33–36], which are, from a physiological perspective, different from suckling piglets. In these studies Gln has been supplemented as single AA [34–36] or as dipeptide [29, 33], with most of the control groups supplemented with isonitrogenous amounts of alanine (Ala). Studies supplementing Gln to piglets during the later suckling period, analyzing parameters after weaning, have been conducted as well [33, 37–39]. Studies with lactating sows suggest that the Gln provided by milk might be limiting for protein synthesis of piglets [39]. Hence, it was also investigated whether supplementation of maternal diet with Gln either during pregnancy or lactation [40] was beneficial, but the effects on piglet growth were inconclusive.

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the effect of oral Gln supplementation on jejunal morphology, development and AA profiles in tissues and digesta in sow reared piglets. Since jejunal morphology as well as development is impaired in LBW compared to NBW piglets [18], we hypothesized that Gln supplementation would improve these parameters in LBW piglets compared to their Ala supplemented control littermates. In addition, changes in jejunal AA profiles could provide insights into jejunal Gln metabolism and its potential role in improving LBW jejunal morphology and development. The aim of this study

was to investigate the effects of oral Gln supplementation to suckling piglets with different birth weights on jejunal characteristics including morphology, AA-metabolism and antioxidative-defense.

3.3. Methods

3.3.1. Animals, experimental design and sample collection

All experimental procedures were approved by the licensing authority State Office for Agriculture, Food Safety and Fishery Mecklenburg-Western Pomerania, Germany (permission No.

7221.3-1-026/16), and performed according to the German Animal Welfare Act following the Directive 2010/63/EU (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes). Healthy German Landrace gilts were bred and gave birth at the Research Institute for Farm Animal Biology experimental pig facility, where the entire study was conducted [41].

The trial design has been previously described in detail [42]. Briefly, male LBW with a mean birth weight (BiW) of 1.1 ± 0.04 kg ($n = 48$; below the lowest BiW quartile of the experimental pig facility) [42] and NBW (1.49 ± 0.04 kg; $n = 48$; represents the middle 50th percentile of piglets born at the experimental pig facility) littermates selected at birth. Within 24 h post farrowing, litter sizes were standardized to 12 piglets and experimental piglets assigned to either Gln (1 g/kg BW/d; $n = 48$) or Ala (1.22 g/kg BW/d; isonitrogenous to Gln; $n = 48$) supplementation. Each LBW or NBW sibling was assigned to a supplementation (Ala, Gln) or age-group (5 or 12 d) in order to obtain similar mean birth weights of LBW (5 or 12 d; LBW-Ala vs. LBW-Gln) or NBW (5 or 12 d; NBW-Ala vs. NBW-Gln) supplementation pairings. Not more than three piglet pairs per sow were selected. Experimental piglets remained with, and were suckled by their respective dam throughout the study, which was performed across 17 experimental blocks. Approximately 24 h post birth, experimental piglets were orally supplemented with Gln or Ala as described [42]. Piglets were supplemented 3 times daily (07:00, 12:00 and 17:00) with 1/3 of the calculated daily dose using disposable syringes. The procedure used to orally dose the piglets with the supplemental amino acids is described in the S1 File. Exclusion criteria for pairs of piglets in this study were loss of body weight for more than two consecutive days, sickness or lack of mobility of already one of the paired piglets.

During the experimental period 5 pairs of LBW and NBW piglets were excluded accordingly. Excluded pairs were replaced by matching pairs of piglets to reach the total sample size ($n = 96$). In addition, no blinding was conducted during the study, with all participants knowing the

experimental group allocations from birth. At 5 and 12 d, piglets were transported to the Research Institute for Farm Animal Biology slaughterhouse 2.5 h prior to euthanasia. Two h before euthanasia each piglet received 33% of their respective daily AA supplement in 6 mL milk replacer (150 g/L water at 45°C; 16.5 MJ of metabolizable energy (ME)/kg, 20.5% crude protein, 10% crude fat, 0.2% crude fiber; Neopigg Rescuemilk 2.0, Provimi, Netherlands). Piglets were electro-stunned and euthanized by exsanguination. Within 5 min post-euthanasia a 35 (5 d) or 40 cm (12 d) jejunal tissue section was sampled from a defined anatomical site in each animal and age group (5 d; ~40 cm, 12 d; ~60 cm prior to the ileocecal junction). Digesta was collected, snap-frozen in liquid N₂, and stored at -80°C for subsequent analysis. The jejunal tissue was then washed with physiological saline and a 5 cm section (most proximal to the ileocecal junction) put into Roti-Histofix (4% paraformaldehyde, Histofix, Roth, Karlsruhe, Germany) for histological analysis. The remaining tissue was diced into small pieces, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analysis.

3.3.2. Jejunal morphometry, histochemistry and immunohistochemistry

Histofixed jejunum samples were cut with a feather-trimming blade (FEATHER, No.130 Type(S)) into 1 large and 2 smaller pieces and prepared as previously described [43]. A microtome (Type 1400 Fa. Leitz Wetzlar, Germany) was used for cutting 5 µm sections from the paraffin blocks. For mucosal morphometry measurements and differentiation of diverse mucin types defined by the carbohydrates displayed, the Alcian blue pH 2.5 periodic acid Schiff staining method described by Liu et al. (2014) [44], was used. The measurements were investigated using a microscope (Photomicroscope BX43F, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus DP72, Tokyo, Japan). Pictures were examined with the cellSens imaging software (v. 1.4, Olympus). Five villi and corresponding crypts were randomly chosen from various well-orientated parts of at least four sections. Sections with undamaged villi and crypts were cut longitudinally. The distance from the tip of the villi to the bottom of the crypts was measured. Morphometric measurements included villus height (VH) (from the tip of the villus to the crypt mouth), villus width (VW), crypt depth (CD) (from the crypt mouth to the base of the crypt), villus height to crypt depth ratio and tunica muscularis thickness (TuM) [44]. For quantification of Immunoglobulin-A (IgA) secreting cells, 5 µm jejunal paraffin sections were mounted on glass slides. After deparaffinization and rehydration, the slides were boiled in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6.0). Endogenous peroxidase was inhibited with 1% aqueous hydrogen peroxide solution for 30 min at room temperature. Slides were then incubated in a humid chamber for 1 h in PBS containing 10% normal horse serum to avoid nonspecific antibody binding. Afterwards, sections were incubated over night at 4°C with the following antibody: goat anti-porcine IgA 1:4000 (NB724, Novus Biologicals, Abingdon, UK). Subsequently washed sections were incubated for 1 h with biotinylated horse anti goat IgG

1:500 (Cat. NO: BA-9500, Vector Laboratories) and then administered with ABC complex (Vectastain elite ABC peroxidase Kit, Standard, Vector Laboratories). To visualize the immune reaction, a 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution (DAB Substrate kit, Vector Laboratories) was applied [45]. An isotype control with a non-specific antibody (goat IgG, AB-108-c, R&D Systems) was conducted to avoid nonspecific binding of the Fc part of the primary antibody. IgA positive cells were counted in the jejunal lamina propria in three areas in five eye fields from four sections per animal according to Waly et al. (2001) [46]. The areas were delineated with cellSens imaging software (v. 1.4, Olympus), ignoring the epithelium, large blood vessels and artefacts. In each area, stained cells were counted and the results were given as positive cells per 10,000 μm^2 of lamina propria tissue [47].

The detection of CD3-positive intraepithelial lymphocytes was performed as described previously [48]. Briefly, for antigen retrieval, slides were heated in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven until boiling for 30 min. Afterwards the primary antibody PPT3 (mouse anti porcine CD3 epsilon, CAT NO 4510-01, Southern Biotech) was applied to the slices. An isotype control with a non-specific antibody (mouse IgG, CAT NO 0102-01, Southern Biotech) was included, to control nonspecific binding of the Fc part of the primary antibody. For visualization of the primary antibody, a two-step indirect method was used (mouse and rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit, ab236466, ABCAM). The secondary antibody was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) labelled micro-polymer (goat anti-rabbit HRP Conjugate, 58009 ABCAM). The whole immunohistochemistry protocol was performed according to a published procedure [49]. To evaluate the stained sample a doubleblind quantification of CD3-positive intraepithelial lymphocytes was performed. Only complete and intact villi (two slices per animal, five villi per slice) were evaluated and cell counts were expressed per 100 enterocytes (Fig 1).

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

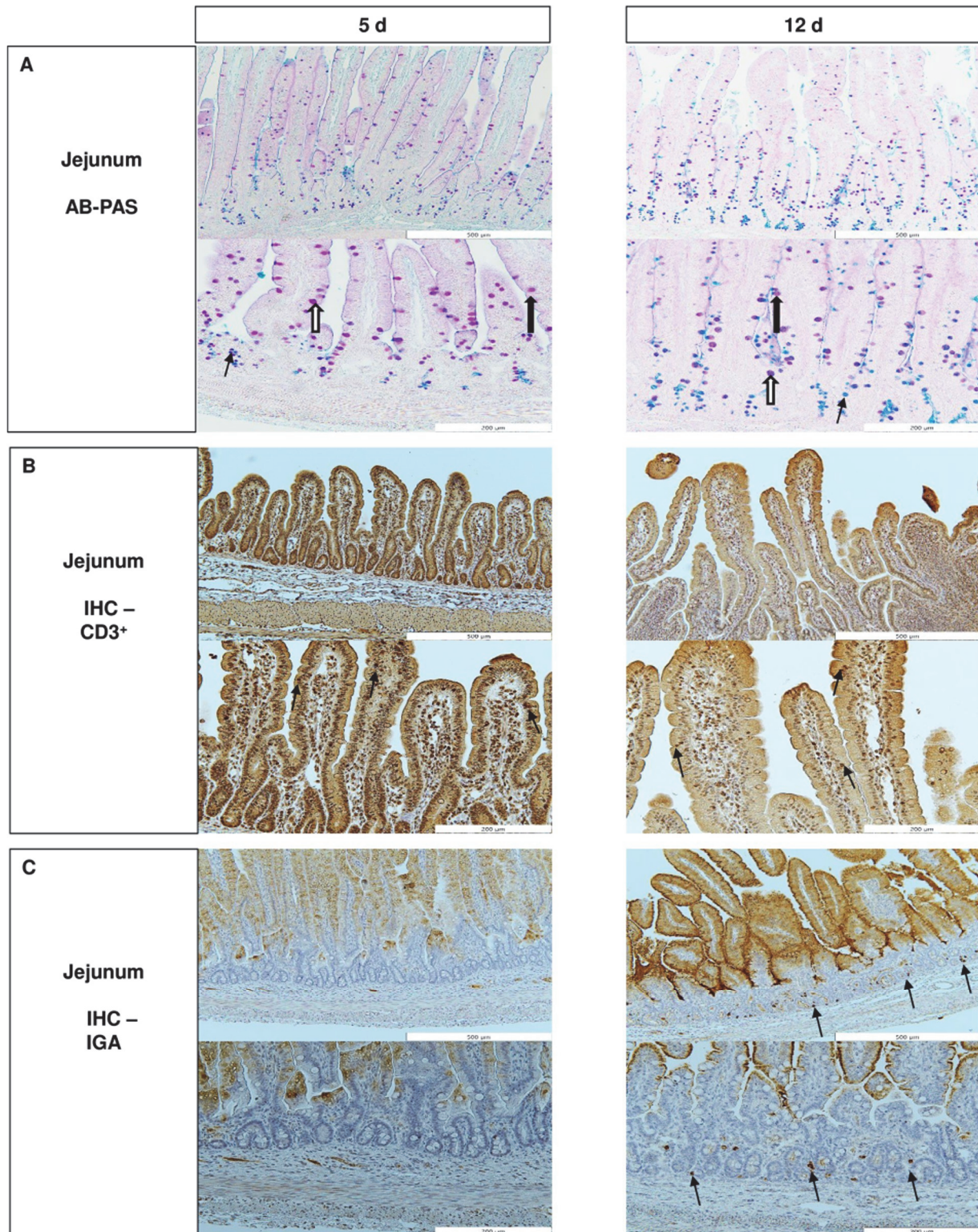


Fig 1. Jejunal Histomorphology and Immunohistochemistry (IHC) of 5 d and 12 d old male suckling piglets. A Alcian blue pH 2.5-periodic acid Schiff stained jejunal tissue with stained goblet cells, different arrows indicating goblet cells containing different mucins. Narrow arrow = acidic mucins, wide closed arrow = neutral mucins, wide open arrow = mixed mucins. 5 d, 12 d: upper picture 100 x, lower picture 200 x magnification. B IHC of CD3, arrows indicating positive stained intraepithelial CD3+ cells in villi. 5 d, 12 d: upper picture 100 x, lower picture 200 x magnification. C IHC of IgA positive stained cells in lamina propria, no IgA positive cells detected at day 5, arrows indicating IgA positive cells. 5 d, 12 d: upper

picture 100 x, lower picture 200 x magnification. Villus tip stained probably by milk derived secretory IgA (SIgA) on the apical side of the enterocytes.

3.3.3. Free and protein bound AA and AA metabolites concentration in jejunal tissue and digesta

Jejunal tissue samples were prepared as previously described [50] and tenfold diluted by ultrapure water for FAA analysis. For the assessment of total amino acids (TAA), an enzymatic hydrolysis was performed [51]. Two μL of supernatant was diluted with 55 μL HEPES buffer (50 mM, pH 7.5), combined with 1 μL of pronase E (54 Units/mL) (Sigma- Aldrich, Munich, Germany), 1 μL of prolidase (250 Units/mL) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), and 1 μL of aminopeptidase M (25 Units/mL) (MP Biomedicals, Santa Ana, California) and incubated at 37°C for 20 h. Samples were centrifuged (4°C) at 16,000 g for 10 min, and diluted 15/100 by ultrapure water. Digesta samples were lyophilized and 5 mg was suspended in 500 μL of ultrapure water. Samples were vortexed for 15 s and centrifuged at 17,000 g, 4°C, for 10 min. The supernatant was transferred to a new test tube without the lipid layer and diluted by factor 4 with ultrapure water for FAA determination. For the assessment of TAA, samples were hydrolyzed enzymatically as described above with the exception that 20 μL of supernatant and 37 μL HEPES buffer were used.

Free AAs, AA metabolites and TAA were measured by HPLC as described earlier [52] using 5 μm C18 columns, 250 x 4 mm HyperCloneTM 120 Å or 250 x 4.6 mm Gemini1 110 Å (both Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Protein bound AA were calculated by subtracting FAA from TAA concentrations.

3.3.4. Jejunal biochemical indices and fractional protein synthesis rate

Total RNA and DNA was extracted from ground jejunal tissue (80–120 mg) according to the manufacturer's protocol (peqGOLD TriFast; VWR International GmbH, Hannover, Germany), whereas total protein was isolated, using a lysis buffer [50] described above. Total RNA and DNA was quantified using a Nanophotometer (Implen GmbH, Munich, Germany), whilst total protein was quantified photometrically using BCA reagent (Biorad Laboratories, Feldkirchen, Germany). Biochemical indices of cell size (protein:DNA ratio), protein synthetic efficiency (protein:RNA ratio) and protein synthetic capacity (RNA:DNA ratio) were calculated as previously described [53].

Fractional protein synthesis rate (FPSR) was determined using the flooding dose method as described [54] with modifications. Piglets were given an intraperitoneal injection of L-²H₅ phenylalanine (Ring-²H₅, 99.1% atom ²H; ²H₅-Phe; Euriso-Top, Saint-Aubin, France) (125

mg/kg BW) in physiological saline (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Germany) one h before euthanasia, to measure the jejunal FPSR.

Fifty mg of ground jejunal tissue was suspended in 0.5 mL of 0.2 M perchloric acid kept on ice, using a sonication tip (Amplitude 80, cycle 0.5, 30 pulses), vortexed and centrifuged (4°C) at 3,000 g for 10 min. The FAA containing supernatant was adjusted to pH 7 using 4 M KOH. After centrifugation (4°C) at 3,000 g for 10 min, the supernatant was dried at 60°C under nitrogen. Samples were treated with N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide to form tert-butyldimethylsilyl-derivatives. Additionally, the protein pellet was used to determine the protein-bound ²H₅-Phe enrichment. After washing the protein pellet twice with 1 mL of 0.2 M perchloric acid and with 1 mL of ultrapure water it was dried at 60°C under nitrogen gas. The dried pellet was hydrolyzed as described [55] and the free AA were converted to tertbutyldimethylsilyl-derivatives. The abundance of ²H₅-Phe was quantified using GC-MS (Quadrupole, GC-MS QP 2010, Shimadzu, Japan, equipped with a Zebron ZB-5HT column, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm column, Phenomenex, USA) as described [55]. The diagnostic ions m/z 336 (M+0) and m/z 341 (M+5) were used to calculate the enrichment as molar per cent excess of ²H₅-Phe. The FPSR was calculated using the following equation:

$$FPSR \left(\%/d \right) = \frac{E_{Protein}}{E_{free}} \times \frac{1}{t} \times 100$$

Where E_{Protein} is the enrichment of ²H₅-Phe in the jejunal tissue protein and E_{free} is the enrichment of ²H₅-Phe in the free AA pool of the jejunal tissue at the time of sampling. The period between ²H₅-Phe injection and sampling is defined as t. The FPSR is expressed as the percentage of tissue protein renewed per d (%/d).

3.3.5. Jejunal transcript abundances related to AA transport, AA metabolism and antioxidative defense

Purification of RNA and cDNA synthesis. Total jejunal RNA (30 μg) extracted for the calculation of biochemical indices was purified using RNeasy minikits (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using a Nanophotometer (Implen GmbH, Munich, Germany). The RNA quality was assessed using a Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), with an RNA integrity number range of 6.9 and 9.7 (mean 8.8 ± 0.8). Purified RNA (500 ng) was reverse transcribed to make cDNA using the Sensi- FAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, Berlin, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Primer design, real time PCR assay and data preparation. Primers were made by Integrated DNA Technologies (IDT, Antwerp, Belgium), and selected from previous studies or designed using the IDT RealTime qPCR Assay design tool. Primers were tested using serial dilutions (1/25, 1/50, and 1/100 diluted cDNA). Due to varying mRNA abundances between targets

either 1/25 or 1/50 dilutions were used for quantification. Primer details are presented in (S1 Table in S1 File). Amplified cDNA samples were analyzed on 96 well plates (Roche) using the LC 96 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Samples were analyzed in duplicate (plus five additional samples: two inter-run calibrators, a no-template and a no-enzyme control and a water control). Quantitative real time PCR was performed using the SensiFAST SYBR No-Rox Mix (Code: 98050, Bioline, Berlin, Germany), with the template (4 μ M) and all reagents at half of the manufacturers recommended volume. The same reaction conditions; enzyme activation and initial denaturation (95°C for 30 s); denaturation/annealing repeated 40 cycles (95°C for 30 s, 60°C for 20 s); and melting curve analysis from 65 to 98°C with 1°C increment every 5 s) were used for all mRNA targets analyzed. The PCR efficiency and quantification cycle values were then obtained for each sample using LinRegPCR v 2014.5 [56]. Average PCR-efficiency and quantification cycle values are reported in S1 Table in S1 File. The GeNorm applet from qBASEplus selected the reference genes from six candidates (5 d: beta actin (ACTB), ribosomal protein S18 (RPS18), and DNA topoisomerase 2-beta (TOP2B), 12 d: peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and ribosomal protein S18 (RPS18)) as the most stably expressed across the BiW and Suppl used in this study. Reference genes were used to normalize target gene mRNA abundance in the qBASEplus software and the C_q-values were converted into log transformed calibrated normalized relative quantities (Log-CNRQ) values, taking into account amplification efficiencies, inter-run variations, and normalization factors. All data was reported as per the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines [57].

3.3.6. Data and statistical analysis

The required experimental sample size (*n*) was calculated per 2 and 3 level factor combination of (1) birth weight (LBW, NBW), (2) supplementation (Ala, Gln) and (3) treatment duration / age group (5 d and 12 d), using CADEMO for Windows ANOV version 4.03 (2000; BioMath GmbH, Rostock, Germany), and the settings $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.20$. The primary outcome measures used to determine *n* were body weight gain and changes in intestinal villus height and abundance of mRNA molecules associated with oxidative status.

Normal distribution was assessed via Shapiro-Wilks criteria, followed by a linear mixed model analysis which was conducted for each of the 143 variables using the MIXED procedure of SAS (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with three fixed factors: (1) birth weight (LBW, NBW), (2) supplementation (Ala, Gln) and (3) age group (5 d and 12 d). Unless otherwise indicated, the group size for each analysis performed was *n* = 12. Deviating group sizes are reflected in the footnotes of the corresponding table. Sow was defined as a random factor which allowed explicit modelling of the non-independence of littermates from the same

sow and improved inference about the fixed effects. ANOVA F-tests for the three fixed effects and their interactions were carried out and the Tukey-Kramer test was applied to compare groups and correct for multiple testing. Least squares means (LSM) and their standard errors (SE) are reported, with the largest SE shown. Differences were considered significant if Tukey-Kramer test was $P < 0.05$.

The linear mixed model analysis revealed that the factor 'age group' had a significant effect on the analyzed set of variables. To identify the variables discriminating the two age groups (5 d and 12 d), the N-integration with Projection to Latent Structures models with Discriminant Analysis (PLS-DA) was applied, using R 4.1.0 (R Core Team, 2021) and the mixOmics package (v6.14.1; [58]). Here, so called 'blocks' of variables measured on the same samples are integrated in a holistic supervised analysis. In this study, all 143 variables were first analyzed together. Cross-validation was used to evaluate the performance of the PLS-DA model, with a 10-fold cross-validation and 1000 repeats to get an accurate estimations of the error rates. Centroid distance was chosen as it is regarded a suitable measure for the complex classification problems [58]. The quality of the PLS-DA model was verified by fold cross-validation using two performance indicators: Q^2 , "goodness of prediction", or predicted variation and R^2 , known as the goodness of fit [59]. All 143 variables were then assigned to ten individual blocks; morphology characteristics ($n = 5$), cell types ($n = 13$), biochemical indices ($n = 7$), mRNA target-molecules ($n = 21$), jejunal tissue (free AA; $n = 20$, AA-metabolites; $n = 10$, PBAA; $n = 20$) and digesta (free AA; $n = 20$, AA-metabolites; $n = 7$, PBAA; $n = 20$). Sample plots for each 'block' of variables are presented only to visualize the potential discriminatory ability of each component in the space spanned by the first two latent variables. A volcano plot was generated using R 4.1.0 (R Core Team, 2021) and the effsize package (v0.8.1; [60]) and qvalue package (v2.22.0; [61]). Effect sizes (Cohen's d) were calculated for each variable based on the estimated least square means of 5 d versus 12 d. The list of p-values of the age group fixed effect estimate was then used in conjunction with a standard false discovery rate (FDR) estimation procedure to find the number of variables to be declared as different while controlling FDR at a specified level of 0.05. The FDR-adjusted p values were calculated using the Benjamini & Hochberg procedure [62].

3.4. Results

3.4.1. Jejunal morphology and abundance of goblet cells, intraepithelial lymphocytes, and IgA positive cells

The VH was affected by Suppl ($P = 0.041$), whereas VW ($P = 0.012$) was influenced by BiW (Table 1). Age affected VH ($P = 0.019$), VW ($P = 0.019$), TuM ($P = 0.020$) and CD ($P < 0.001$). The CD in the jejunum was higher at 12 d than at 5 d in LBW-Ala piglets ($P < 0.001$) (Table 1). Mixed mucins containing goblet cells in villi were affected by Suppl ($P = 0.007$) (Table 2). Age affected the number of mixed mucins containing goblet cells in crypts ($P = 0.025$) and villi ($P = 0.020$), as well as the total number of goblet cells in the crypt ($P = 0.029$). We could not observe IgA positive stained cells in the jejunal lamina propria of 5 d old piglets. In 12 d old piglets supplementation influenced the number of IgA positive cells in the lamina propria next to the crypts (Area 3) ($P = 0.048$) (S2 Table in S1 File). The number of intraepithelial lymphocytes CD3+ cells in the jejunal villi (S3 Table in S1 File) and the number of CD3+ cells in crypt area did not differ among groups.

Table 1. Jejunal morphology characteristics in low and normal birth weight male suckling piglets.

Item	Age (d)	Ala		Gln		SE	P values ¹		
		LBW	NBW	LBW	NBW		BiW	Suppl	Age
Villus height (µm)	5	812	718	789	872	65.3	0.265	0.041	0.019
	12	899	855	1061	935	66.5			
Villus width (µm)	5	95.3	97.8	95.3	101	2.87	0.012	0.256	0.019
	12	99.9	105	103	107	2.93			
Crypt depth (µm)	5	113 ^e	126	124	125	5.90	0.949	0.703	<0.001
	12	150 ^f	145	149	142	5.90			
Villus height to crypt depth ratio	5	7.25	5.90	6.67	7.12	0.51	0.274	0.098	0.622
	12	6.17	6.00	7.11	6.78	0.52			
Tunica muscularis thickness (µm) ²	5	107	105	122	102	12.3	0.814	0.882	0.020
	12	127	144	128	126	12.2			

^{e,f} Labeled LSM within a column within one Suppl and BiW group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test). Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; $n = 12$ /group (5, 12 d).

¹ ANOVA F test. None of the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

² Tunica muscularis was damaged due to the thawing procedure. Therefore group size deviated from $n = 12$ for the parameter Tunica muscularis thickness. 5 d LBW-Ala, 5 d LBW-Gln, 12 d NBW-Gln, 12 d LBW-Gln, and 12 d NBW-Ala $n = 11$.

Table 2. Number of jejunal goblet cells in low and normal birth weight male suckling piglets.

Item ²	Age (d)	Ala		Gln		SE	P values ¹	
		LBW	NBW	LBW	NBW		Age	
Villus	Acid	5	3.97	4.23	4.65	4.83	0.59	0.588
		12	4.83	4.92	4.7.0	4.38	0.60	
	Neu	5	6.58	8.24	6.76	7.02	0.72	0.901
		12	6.71	7.41	7.07	7.10	0.74	
	NA	5	7.31	8.52	5.96	6.10	0.64	0.020
		12	5.52	6.14	5.11	5.51	0.65	
Total	5	17.8	21.0	17.4	18.0	1.38	0.318	
	12	17.1	18.5	16.9	17.0	1.41		
Crypt	Acid	5	21.7	20.0	22.2	24.5	1.85	0.081
		12	18.2	18.4	19.0	21.9	1.87	
	Neu	5	12.0	13.6	12.9	11.6	1.74	0.755
		12	11.7	13.8	12.3	14.2	1.77	
	NA	5	22.6	21.6	21.6	20.5	1.58	0.025
		12	18.3	19.0	17.9	19.3	1.59	
Total	5	56.5	55.3	56.5	56.5	2.9	0.029	
	12	48.2	51.1	49.1	55.2	2.92		

Values are LSM ± SE of goblet cells containing different mucins per 1 mm basement membrane, the largest SE is shown; n = 12/group (5, 12 d).

¹ ANOVA F test. Suppl had a significant effect on NA mucins in villus ($P < 0.01$); neither the fixed factor (BiW) nor the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

²Acid = acidic mucins; NA = mixed neutral and acidic mucins; Neu = neutral mucins.

3.4.2. Jejunal free AA and AA metabolite concentrations

There was an effect of Suppl on Gln, of BiW on Cys, and of Age on the concentration of all FAA measured in the jejunal tissue (S4 Table in S1 File), with the exception of the AA metabolites citrulline, ornithine and taurine (S5 Table in S1 File). The interaction BiW x Suppl affected α -Aminoadipic acid (Aad), whereas the interaction BiW x Suppl x Age was significant for Asp, Gln, His, Ile, Met, Ser, Thr, Val, the branched-chained AA, and the Aad concentration. The concentration of Gln was higher in 5 d NBW-Gln compared to NBW-Ala piglets ($P = 0.044$). The concentration of hydroxyproline ($P = 0.029$) was higher in all four 5 d groups than in the 12 d groups. Higher concentrations of Aad and Ala ($P < 0.028$) were found in the jejunal tissue of 5 d group compared to 12 d group with exception of NBW-Ala. The jejunal concentrations of Ser ($P = 0.006$), Gln, His, Ile, Thr ($P = 0.041$), and the group of dispensable AAs ($P = 0.009$) were higher in 5 d compared to 12 d LBW-Ala piglets. The concentrations of Glu and 3-Methylhistidine ($P = 0.042$) were higher in 5 d compared to 12 d LBW-Gln piglets. In NBW piglets supplemented with Gln the concentrations of Gln ($P = 0.007$), Asp, Glu, Ser, the group of dispensable AA ($P = 0.029$) were higher at 5 d compared to 12 d. In 12 dLBW-Gln ($P = 0.010$) and NBW-Ala ($P < 0.001$), the jejunal Gly concentration was higher compared to 5 d.

The Block PLS-DA showed a separation between the blocks jejunal FAA and AA metabolites (Fig 2B and 2C), probably contributing to the 5 and 12 d group separation observed in the PLS-DA analysis of all experimental blocks (Fig 2; 1 comp, $R^2 = 0.65$, $Q^2 = 0.65$). A subsequent univariate analysis (volcano plot; Fig 3) showed that four jejunal FAA and AA metabolites were different between the two age groups (Cohen's $d \geq 1$, $FDR \leq 0.05$). The FAA in jejunal tissue Pro and the AA metabolite β Ala were lower in 12 d compared to 5 d age groups, whereas the Cys and the AA metabolite Car were higher in the 12 d compared to the 5 d age groups (Fig 3) (S6 Table in S1 File).

3.4.3. Jejunal protein bound AA concentrations

There was an effect of Age on the concentration of all PBAAAs (except Pro), whereas BiW affected Asn and Ile concentrations. The concentration of protein bound Glu, Ser ($P = 0.049$), the group of indispensable AA, branched-chained AA, dispensable AA and the group of total AA ($P = 0.029$) were higher in all 4 groups of 5 d piglets compared to the groups of 12 d piglets (S7 Table in S1 File). The concentration of protein bound Asn and Met ($P = 0.031$) was higher in groups of 5 d piglets compared to the respective groups of 12 d piglets except for the group of NBW-Ala. Higher concentrations of protein bound Arg and Trp ($P < 0.047$) were found in the jejunal tissue of the 5 d group in LBW-Ala and NBW-Gln compared to the respective 12 d groups. Lower concentrations of protein bound Arg and Trp ($P < 0.029$), were found in 12 d

compared to 5 d LBW-Ala piglets. The concentrations of Gly ($P < 0.048$) were lower in 12 d compared to 5 d NBW-Gln piglets.

Block PLS-DA indicated that jejunal PBAA (Fig 2D) may be contributing to the 5 and 12 d group separation observed in the PLS-DA analysis of all experimental blocks (Fig 2A). A subsequent univariate analysis (volcano plot) showed that 10 variables (jejunal protein-bound Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Val, Ala, Asp, Cys, and Tyr) were lower in 12 than in the 5 d age groups (Cohen's $d \geq 1$, $FDR \leq 0.05$), (Fig 3) (S6 Table in S1 File).

3.4.4. Free and protein bound AA concentrations in jejunal digesta

The concentration of the digesta γ -aminobutyric acid was influenced by Suppl, whereas the FAAs Asp and Ser were affected by BiW, while Aad, α -aminobutyric acid, and Orn were affected by Age. The interaction BiW x Suppl was significant for digesta free Glu, α -aminobutyric acid while the interaction Age x Suppl affected Arg and Asp (S8 and S9 Tables in S1 File). The concentration of digesta free Aad was lower in NBW-Gln ($P < 0.001$) at 5 d compared to 12 d, and in LBW-Gln compared to NBW-Gln piglets at 5 d ($P = 0.008$). Additionally, the concentration of free Aad was higher in NBW-Gln than in NBW-Ala at 5 d ($P = 0.006$). Age was significant for the concentration of the digesta PBAA Lys, Gln, and Pro (S10 Table in S1 File).

The concentration of protein-bound Lys increased from 5 d to 12 d, in NBW-Ala piglets ($P = 0.017$).

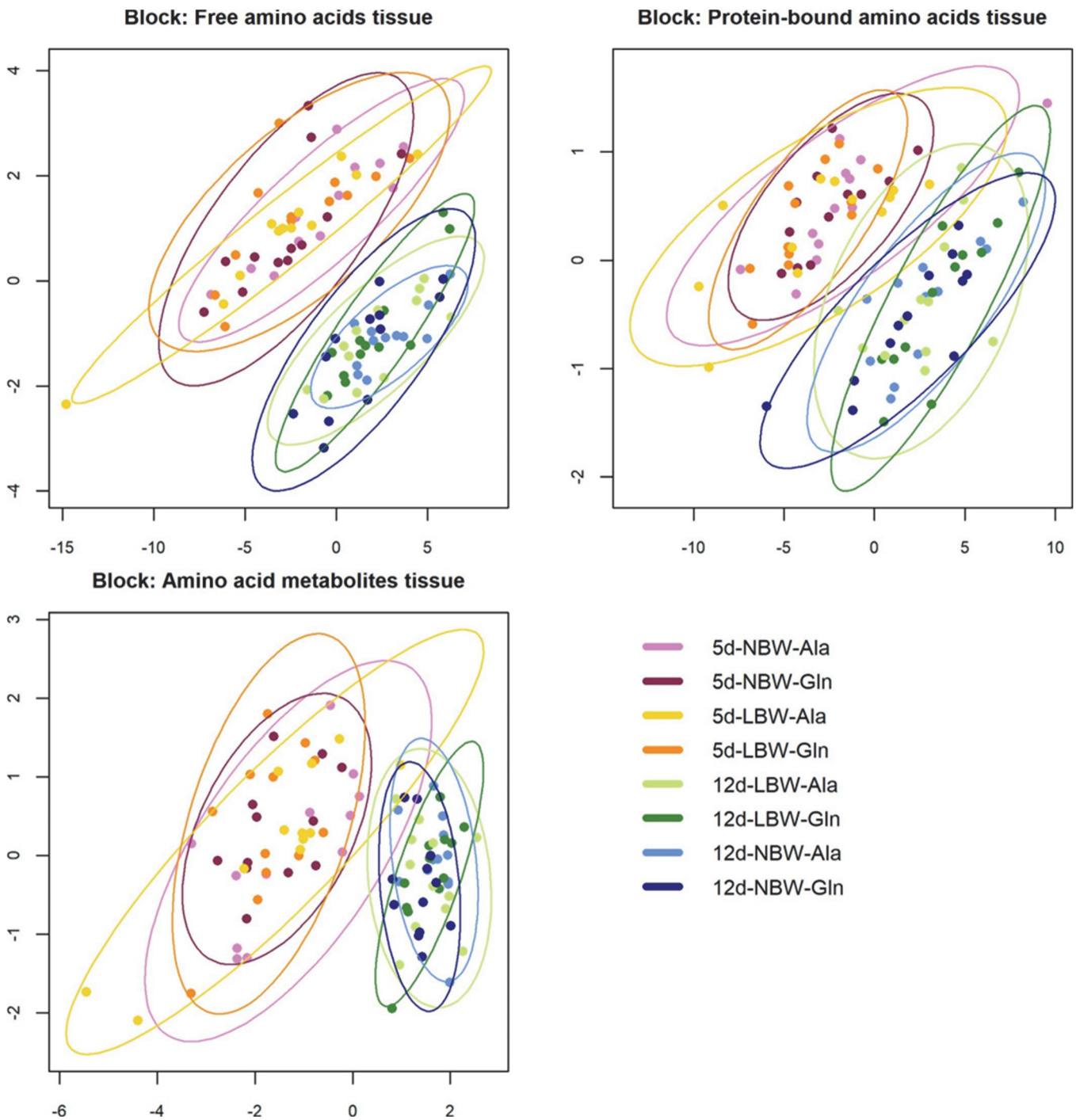


Fig 2. Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). Sample plots of the block PLS-DA of all 143 jejunal variables assigned to ten variable groups ('blocks') and measured in 96 samples. Shown are the sample plots for the three blocks with the best discriminatory ability: Free amino acids tissue, Proteinbound amino acids tissue, Amino acid metabolites tissue. The other seven blocks are shown in the supplementary material (S1 Fig in S1 File). The colours indicate the eight experimental groups of the 3-factorial crossed design (birth weight: LBW/NBW, supplementation: Ala/Gln and age group: 5 d/12 d) and highlight the main comparison of the two age groups (reddish: 5 d; bluegreen: 12 d).

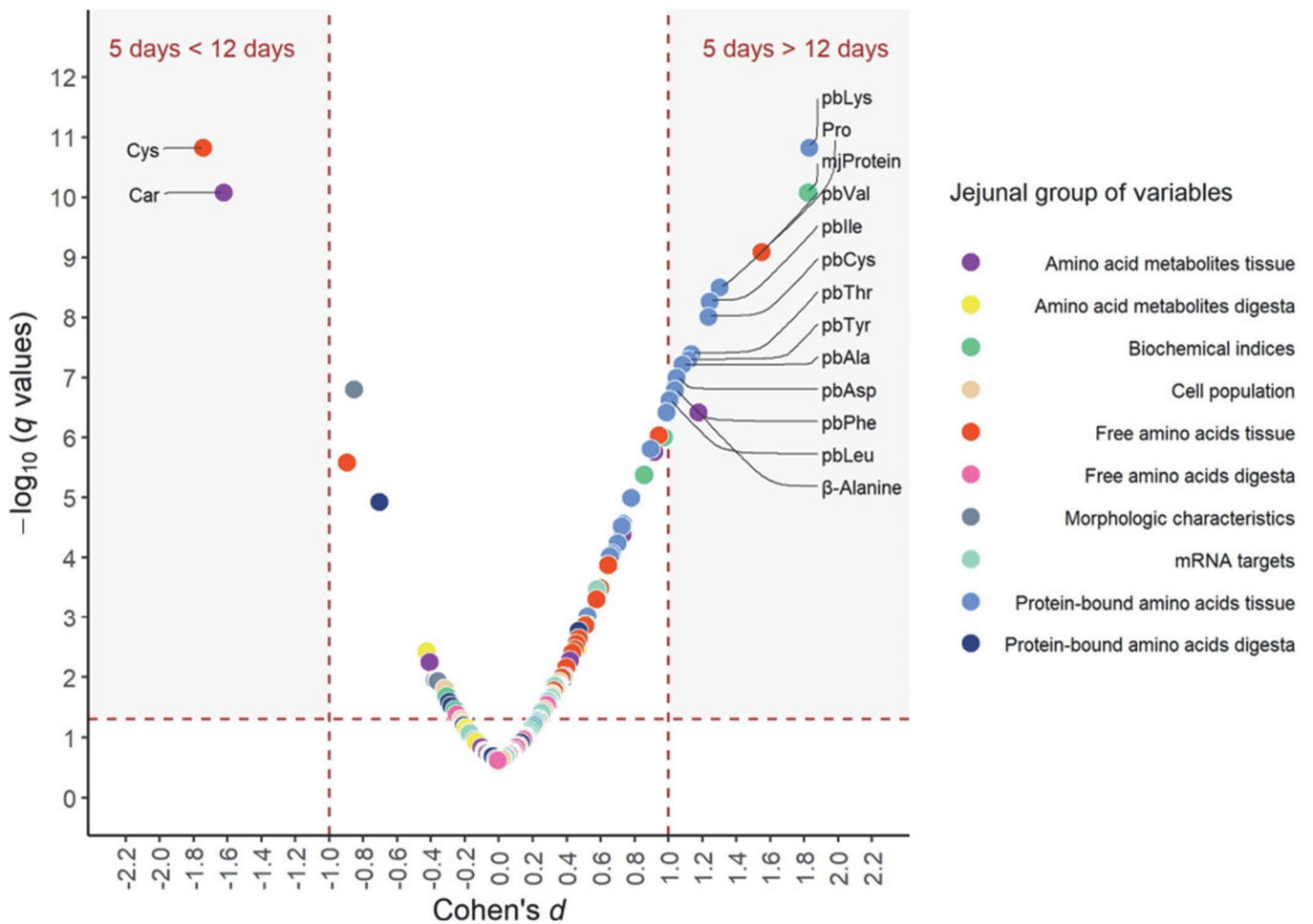


Fig 3. Volcano plot of jejunal variables analysed between 5 and 12 d old suckling piglets. Comparison of quantities of all 143 variables measured in 5 d and 12 d old suckling piglets. Q-values estimating the false discovery rate (FDR) were calculated for each variable from p-values of multiple Tukey-Kramer-tests comparing 5 d and 12 d old piglets. Effect sizes (Cohen's d) were calculated for each variable based on the differences in estimated marginal means and standard deviations of 5 d versus 12 d old piglets. Differences are classified as being substantial (grey shaded area) if FDR is limited to 0.05 ($q < 0.05$) and if the effect size of Cohen's $d < 1$ (5 d is smaller than 12 d) or Cohen's $d > 1$ (5 d is larger than 12 d). The 16 variables meeting this condition are annotated.

3.4.5. Jejunal biochemical indices and fractional protein synthesis

Protein, RNA, DNA ($P < 0.001$) concentrations and the RNA/DNA ratio ($P < 0.044$), reflecting protein synthetic capacity, in jejunal tissue were affected by Age. The concentration of DNA ($P = 0.005$) and RNA ($P = 0.050$) was higher in 5 d compared to 12 d LBW-Gln, NBW-Ala and NBW-Gln piglets (Table 3). Jejunal FPSR was unaffected by any of the main factors (Table 3). Subsequent univariate analysis (volcano plot) showed that the variable protein concentration was lower (FDR $P < 0.001$) in the 12 d compared to 5 d age group (Fig 3) (S6 Table in S1 File).

Table 3. Jejunal biochemical indices in low and normal birth weight male suckling piglets.

Item	Age (d)	Ala		Gln		SE	<i>P</i> values ¹
		LBW	NBW	LBW	NBW		Age
DNA (µg/mg _{FM} ²)	5	4.38	4.90 ^e	4.89 ^e	5.17 ^e	0.30	<0.001
	12	3.74	3.27 ^f	3.23 ^f	3.09 ^f	0.31	
Protein (µg/ mg _{FM} ²)	5	117 ^e	1084	119 ^e	114 ^e	3.27	<0.001
	12	81.9 ^f	83.4 ^f	86.7 ^f	84.0 ^f	3.28	
RNA (µg/ mg _{FM} ²)	5	3.97	4.41 ^e	4.15 ^e	3.99 ^e	0.18	<0.001
	12	3.23	3.24 ^f	3.10 ^f	3.16 ^f	0.19	
RNA/DNA	5	0.94	0.92	0.86	0.79	0.11	0.044
	12	0.97	1.07	1.13	1.13	0.11	
Protein/RNA	5	29.9	25.0	29.6	29.7	1.53	0.196
	12	25.9	26.3	28.6	27.5	1.53	
Protein/DNA	5	27.6	22.8	25.5	22.7	3.09	0.085
	12	25.9	28.9	31.8	29.5	3.12	
FPSR (%/d) ³	5	60.7	69.8	72.8	71.6	7.42	0.123
	12	55.7	61.7	57.8	58.7	7.56	

^{e,f} Labeled LSM within a column between one Suppl—birth weight group without a common letter differ, *P* < 0.05 (Tukey-Kramer test). Values are LSM ± SE, the largest SE is shown; *n* = 12/group (5, 12 d).

¹ ANOVA F test. None of the other fixed factors (Suppl or BiW) or interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant (*P* > 0.05).

² FM = Fresh matter

³ Because of an insufficient accumulation of ²H₅-Phe in jejunal tissue, the group size deviated from *n* = 12 for jejunal FPSR. 5 d LBW-Gln, 12 d NBW-Gln, 12 dLBW-Gln *n* = 11.

3.4.6. Jejunal transcript abundance related to AA transport, AA metabolism and antioxidative defense

The BiW class affected AST-2 ($P = 0.020$) whereas Age influenced the mRNA abundance of solute carrier family 1 member 5 (SLC1A5), solute carrier family 1 member 4 variant 1 (SLC1A4V1), aspartate aminotransferase 2 (AST-2), Glu cysteine ligase (GCL), glutathione synthetase (GSS) ($P < 0.05$), and succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) ($P < 0.001$) (S11 Table in S1 File). The BiW x Age interaction affected PSMC3 ($P = 0.039$). The mRNA abundance of succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) was higher in 5 d compared to 12 d LBW-Ala piglets ($P = 0.009$).

3.5. Discussion

The SI of LBW piglets is developmentally and functionally compromised compared to NBW individuals [63, 64]. Oral Gln supplementation has been previously shown to be beneficial for the jejunal development and function of piglets around weaning [34, 35], however only few studies examined effects of Gln supplementation in piglets during the suckling phase [33, 38, 65]. While most studies have looked at weaned piglets, the present work is focused on the early suckling period, which to our knowledge has not been studied in this species. The jejunum is critical for the digestion of milk and absorption of nutrients. Therefore, in this work we focused on this section of the intestine and used a wide range of analytical methods to characterize potential effects of glutamine or alanine supplementation.

Our outgoing hypothesis was that the jejunal morphology and development of LBW compared to NBW male piglets benefits from Gln as compared to Ala supplementation. In addition, changes in jejunal AA profiles could provide insights into Gln jejunal metabolism and its potential role in improving LBW jejunal morphology and development.

3.5.1. Comparison among supplementation groups

Oral Gln supplementation to LBW suckling piglets was not associated with changes in any of the jejunal parameters measured, when compared to LBW-Ala or NBW-Gln control groups, at 5 d or 12 d of life. In addition, no effects were observed when Gln supplementation was assessed within each age group irrespective of BiW. In vitro studies in intestinal porcine enterocytes have shown that media supplemented with 2 mM Gln increased FPSR

[66] and cell growth [67], both of which were unaffected in this study. However, this is a concentration 2–8 times higher than that reported in piglet plasma [38, 68] and thus translation of results is difficult. Furthermore, more recent in vitro studies on intestinal porcine enterocytes

have shown effects of Gln on ATP production and apoptosis [28, 69]. In LPS-challenged suckling piglets, Haynes et al. (2009) showed that oral Gln supplementation prevented endotoxin related villus atrophy [38]. In vivo studies investigating effects of Gln supplementation on intestinal physiology have been conducted in piglets at the end of the suckling period, but different parameters were evaluated [65]. However, the majority of studies were conducted in weaned piglets [29]. Their physiological conditions are very different from that of the suckling piglets used in this study as intestinal AA-metabolism, local immunity and cellular population are changing [15]. It has been reported that Gln supplementation during weaning improved growth performance and intestinal health by preventing villus atrophy and reducing antioxidative stress [33–35, 70]. Hsu et al. (2012)

[71] observed increased tunica muscularis thickness in jejunum and ileum in weaned piglets upon Gln supplementation. In an infection study with pathogenic *E. coli* Gln supplementation of weaned piglets inhibited villus atrophy [72]. Thus, it appears that Gln may have a protective effect on the SI under stressful conditions such as infection [38, 72] and weaning [33–35, 70]. Another study reported that Gln supplementation had similar effects on growth performance and plasma concentration of TNF-alpha in weaned piglets as antibiotic treatment [36]. Although we observed in a companion study with the same experimental animals that plasma Gln concentrations were higher 2 h after oral Gln supplementation in the 5 d and 12 d old piglets compared to Ala supplementation [42], in jejunal digesta and tissue the FAA and PBAA Gln concentrations and that of its metabolite Glu were not different between the Ala and Gln piglets. This may indicate that the Gln dose was absorbed in the proximal SI (duodenum and/or proximal jejunum) [29].

It has been reported that excess Gln is stored in the skeletal muscle [73] and that skeletal muscle is one of the main locations of Gln synthesis [74]. Glutamine is released under stressful conditions such as starvation or infection from the skeletal muscle, and the synthesis of Gln increases under such conditions [74]. A companion paper, using the same animals as in this study, showed no difference in free Gln concentrations in the *M. longissimus dorsi* of LBW-Gln when compared to LBW-Ala or NBW-Gln groups, at 5 d or 12 d of life [75]. However, the concentration of Ala in *M. longissimus dorsi* in the Ala supplemented NBW and LBW piglets was higher than in the Gln littermates at 5 and 12 d of life. A study by Stoll et al. (1998) [76], using ¹³C labelled AAs in suckling pigs, showed that Gln has a negative portal balance, indicating that Gln is utilized intensively by the SI. Thus, our observations, together with FAA profiles from the duodenum of these animals that show higher Gln concentrations in LBW-Gln and NBW-Gln compared to their Ala birth weight companions (unpublished data) suggest, that the supplemental Gln is already absorbed in more proximal regions of the SI. Additionally, it seems that the skeletal muscle as a Gln storage tissue [73], may not be relevant within the 2 h time period between Gln administration and sampling in this study.

3.5.2. Comparison between birth weight groups

A possible reason for the absence of differences in jejunal development between LBW-Gln and LBW-Ala or NBW-Gln piglets could be linked to the birth weight range of LBW piglets in this study (0.8–1.2 kg vs. 1.4–1.8 kg). In fact, the range of BiW reported for LBW piglets is rather wide [24, 64, 77]. Apparently, differences in intestinal development and function between low and normal BiW piglets, were reported mostly in piglets with much lower body weights than used here [77–79]. For example, Xu et al. (1994) observed reduced jejunal VH, CD, intestinal thickness, total DNA, RNA and protein content in very low birth weight piglets (0.59 ± 0.34 kg) at birth (prior to suckling) compared to normal BiW (1.32 ± 0.47 kg) littermates. Another study investigating newborn low birth weight piglets (0.83 ± 0.04 kg) and normal birth weight piglets (1.66 ± 0.07 kg) showed decreased length and weight of the SI, decreased VH:CD ratio and reduced expression of genes related to oxidative defense in low birth weight piglets [80]. In contrast, neither Wang et al. (2016) [79] nor Wiyaporn et al. (2013) [81] did observe differences in proximal jejunum VH, or CD between newborn un-suckled LBW piglets (0.81 ± 0.02 kg; and 0.88 ± 0.02 kg) compared to normal littermates (1.30 ± 0.03 kg; and 1.47 ± 0.03 kg).

Similarly, small intestinal villus height, width and depth did not differ according to BiW (Huygelen et al., 2015). Additionally, Thongsong et al. (2019) [82], utilizing the same experimental piglets as Wiyaporn et al. (2013), did not find an effect of BiW on mRNA abundance of jejunal glucose, peptide and AA transporters including SLC7A8, which we determined in the present study. In the present study we did not determine jejunal parameters in newborn un-suckled piglets, thus it is not known whether the jejunal parameters measured differed at birth in our piglets. Interestingly, Wang et al. (2016) reported that in un-suckled low BiW piglets' jejunal permeability and tight junction (OCLN) mRNA abundance were higher, and antioxidant scavenger (Gpx1, CAT) mRNA abundance was lower compared to normal BiW littermates. Yet by 3 d of life, the differences were no longer present. The absence of difference on mRNA level related to oxidative defense in our study might indicate that LBW were not challenged by additional oxidative stress. Also Huygelen et al. (2015), did not observe differences in SI cell proliferation and in intestinal barrier function between low and normal BiW piglets at birth and after 3, 10, and 28 d of suckling. These results suggest three possibilities, (1) that the intestinal parameters measured in our study do not differ between low and normal BiW piglets, or (2) that differences observed at birth prior to suckling might have already disappeared during postnatal development if the nutritional requirements of piglets are met as reviewed by Everaert et al. (2017). Thirdly, it cannot be excluded that low birth weight piglets surviving the first 3 days of life are more vital and less comparable to the very low birth weight

piglets with compromised intestinal development, which leads to a bias of selection of these piglets.

3.5.3. Comparison of piglet age groups

The development of the SI during the suckling phase is characterized by rapid growth, both on a macroscopic [10] and microscopic [77] scale. Several studies indicate that SI maturation is accompanied with changes in enterocyte metabolism [15, 26, 83] and nutrient absorption kinetics [84]. In the current study, jejunal morphological and immunological markers as well as nucleic acid, protein and AA profiles were compared between 5 d and 12 d old piglets, irrespective of the Suppl or BiW group. Morphologically, higher CD, VH, VW and TuM were observed in the 12 d compared to the 5 d group, consistent with previous studies conducted in sow-reared piglets [10, 19, 77, 85]. Longer and wider villi, as well as deeper crypts observed in 12 d compared to 5 d old piglets reflect an increased absorptive area. An increasing CD also indicates a higher crypt cell production and is an indicator for maturation of villous enterocytes [85]. The higher TuM observed in the older age group indicates jejunal cell proliferation and maturation. It should be noted that conflicting results in regard to the development of VH with age have been reported [19, 77, 86], which appear to be related to differences in piglet age, SI segment, villus atrophy, creep feed consumption and milk intake [12, 86]. Generally, the shape and length of the villi in the small intestine changes with weaning [12]. We observed lower staining of mixed mucins containing goblet cells in the villi and crypts and lower total number of crypt goblet cells in piglets of the 12 d compared to the 5 d group. Goblet cells containing different mucin types act as an innate defense mechanism, where the mucins protect the gastrointestinal tract by acting as a diffusion and micro-ecological barrier [87]. The observed decrease may suggest that at 12 d of age the mucosal barrier function built by mucins is changing due to immune system maturation, or may indicate changing luminal bacteria composition [88]. In addition, the abundance of IgA positive cells in the lamina propria was assessed. These IgA positive cells are B-cells that are derived from the antigen-specific IgA-committed B cells in Peyer's patches, which migrate to the lamina propria and function as part of the innate immune defense [89]. Consistent with previous studies [90, 91] our results show that IgA positive cells were mainly located in the lamina propria and were detected only in the 12 d group. The abundance of IgA positive plasma cells have been shown to be influenced by age [90, 92], commensal microbiota [93], and diet [94]. Taken together, these results indicate that the jejunum of the piglets in this study matures morphologically and immunologically from 5 d to 12 d of age and neither differences in maturation due to BiW nor to AA supplementation were observed.

Multivariate analysis via block PLS-DA showed that jejunal FAA, PBAA and amino-metabolites were the only variable blocks significantly affected by piglet age. Univariate analysis of the individual variables within each block confirmed this observation, revealing altered jejunal concentrations for almost all of the individual and grouped FAA and PBAA when 12 d were compared to 5 d piglets. A subsequent, more stringent univariate analysis (volcano plot) was performed to identify highly significant variables contributing to the age group separation in these blocks. Identified were Pro and β -Alanine, which were lower in the 12 d animals compared to 5 d, whilst the opposite was observed for Cys and Carnosine. The importance of these AA and amino-metabolites for the age-dependent development of the porcine intestine are not fully understood. It has been previously reported [84] that the capacity to absorb AA per length unit of intestine decreases, as the total length of intestine increases, potentially explaining the decrease for several AA concentrations observed in the older piglet group used in this study. Moreover it was shown that AA metabolism in the jejunum of piglets changes within the different periods of the suckling phase [83]. Why this occurs is currently not understood, but it could be linked to differences in the intestinal microbiota [95], changes in cell structure and function, or in AA metabolism [83] and absorption [11, 96]. In the present study, lower jejunal protein, RNA and DNA concentrations and increased RNA to DNA ratio, a measure of ribosomal RNA content or protein synthetic capacity was observed in piglets of the 12 d compared to the 5 d group. The DNA concentration is a marker of cell number, and lower concentrations in the 12 d group indicates that the numbers of cells per mg of jejunal tissue is lower potentially explaining why the protein, RNA, FAA and PBAA concentrations are decreased. Why the cell number decreased from 5 d to 12 d is not fully understood, but it may be linked to reappearing rise in apoptosis, after an enhanced mitosis accompanied by a reduction of apoptosis during the first days after birth [97]. In addition it should not be overlooked, that intestinal cell turnover is affected by nutrition and specific nutrients [15]. Whilst protein synthetic capacity increased, there was no effect of age on FPSR or the ratio of protein to DNA. Thus, in terms of protein synthesis, there appears to be no effect of age in these very young piglets. Furthermore, the mRNA abundance of genes related to Gln/Ala-uptake and metabolism and glutathione production was assessed. We observed that the mRNA abundance of one Gln (SLC1A5) and one Ala (SLC1A4 transcript variant 1) transporter, two enzymes involved in Gln metabolism (AST-1, GLUD-1, SDHA) and three involved in the glutathione synthesis pathway (GCL, GSS and GPX4) were lower in piglets from the 12 d compared to the 5 d group. The GCL encodes the rate-limiting enzyme for the glutathione production, whilst GSS encodes the enzyme involved in the subsequent step and our results may indicate that oxidative defense via glutathione production was lower in piglets from the 12 compared to 5 d group. This observation is similar as in a previous study which showed a downwards trend of GPX4 expression, an enzyme converting glutathione to glutathione-

disulfide in the presence of radical oxygen species, in the jejunum of suckling piglets after the age of d 14 [98]. The mRNA abundance of antioxidative enzymes is not only dependent on the age of the individual piglet, but on the sampled tissue as well [99]. Thus, within the context of earlier studies on ontogenetic development of the jejunum in suckling piglets, the results from this study are consistent with an adequate physiological development independent of BiW or Gln supplementation.

3.6. Conclusion

This study is the first to investigate the effect of oral Gln supplementation on jejunal development and AA profiles in suckling low and normal birth weight piglets. Results show that Gln as compared to Ala supplementation and BiW appears to have only small effects on the measured jejunal parameters, whereas the effect of age was significant. These novel findings suggest that oral Gln supplementation might not be an appropriate way to stimulate the development of jejunum in the suckling period. However, it is conceivable that Gln might be beneficial in a more challenging environment. Thus further research is warranted to investigate more proximal sections of the GIT, or cellular proliferation, microbial composition and the abundance of tight junction proteins during jejunal development.

3.7. Acknowledgments

The authors are grateful to K. Schröter and L. Ebersbach (FU Berlin), B. Mielenz, V. Hofer-Pretz, K. Karparti, U. Lüdtke, and E. Wünsche (FBN) for excellent technical assistance. We also thank the staff of the Experimental Animal Facility for Pigs of the Research Institute for Farm Animal Biology (FBN) for their support in conducting the animal experiment.

3.8. Author Contributions

Conceptualization:	Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.
Data curation:	Johannes Schregel, Johannes Schulze Holthausen, Quentin L. Sciascia, Zeyang Li, Solvig Görs.
Formal analysis:	Johannes Schregel, Quentin L. Sciascia, Anja Eggert, Armin Tuchscherer.
Funding acquisition:	Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.
Investigation:	Johannes Schregel, Johannes Schulze Holthausen, Quentin L. Sciascia, Zeyang Li, Solvig Görs.
Supervision:	Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.
Visualization:	Anja Eggert.
Writing – original draft:	Johannes Schregel, Johannes Schulze Holthausen.
Writing – review & editing:	Quentin L. Sciascia, Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.

3.9. References

1. Huting AMS, Middelkoop A, Guan X, Molist F. Using Nutritional Strategies to Shape the Gastro-Intestinal Tracts of Suckling and Weaned Piglets. *Animals (Basel)*. 2021; 11(2). Epub 2021/02/11. <https://doi.org/10.3390/ani11020402> PMID: 33562533; PubMed Central PMCID: PMC7914898.
2. Ferenc K, Pietrzak P, Wierzbicka M, Matyba P, Grzesiuk E, Gajewski Z, et al. Alterations in the liver of intrauterine growth retarded piglets may predispose to development of insulin resistance and obesity in later life. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2018; 69(2). Epub 2018/06/20. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.06> PMID: 29920475.
3. D'Inca R, Che L, Thymann T, Sangild PT, Le Huerou-Luron I. Intrauterine growth restriction reduces intestinal structure and modifies the response to colostrum in preterm and term piglets. *Livestock science*. 2010; 133(1–3):20–2. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.015> WOS:000284726000004.
4. Hales J, Moustsen VA, Nielsen MB, Hansen CF. Individual physical characteristics of neonatal piglets affect preweaning survival of piglets born in a noncrated system. *Journal of animal science*. 2013; 91 (10):4991–5003. Epub 2013/10/01. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5740> PMID: 24078619.
5. Baxter E, Jarvis S, Palarea-Albaladejo J, Edwards S. The Weaker Sex? The Propensity for Male-Biased Piglet Mortality. *Plos One*. 2012; 7:e30318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030318> PMID: 22272334.
6. Marchant J, Rudd AR, Mendl M, Broom D, Meredith MJ, Corning S, et al. Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems. *The Veterinary record*. 2000; 147:209–14. <https://doi.org/10.1136/vr.147.8.209> PMID: 10994922.
7. Beaulieu AD, Aalhus JL, Williams NH, Patience JF. Impact of piglet birth weight, birth order, and litter size on subsequent growth performance, carcass quality, muscle composition, and eating quality of pork. *Journal of animal science*. 2010; 88(8):2767–78. Epub 2010/04/27. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2222> PMID: 20418451.
8. Sciascia Q, Das G, Metges CC. REVIEW: The pig as a model for humans: Effects of nutritional factors on intestinal function and health. *Journal of animal science*. 2016; 94:441–52. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9788> WOS:000385006900099.
9. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clinical medicine insights Pediatrics*. 2016; 10:67–83. Epub 2016/07/22.

<https://doi.org/10.4137/CMPed.S40070> PMID: 27441006; PubMed Central PMCID: PMC4946587.

10. Adeola O, King DE. Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs. *Journal of animal science*. 2006; 84 (1):112–8. Epub 2005/12/20. <https://doi.org/10.2527/2006.841112x> PMID: 16361497.
11. Burrin DG, Davis TA, Ebner S, Schoknecht PA, Fiorotto ML, Reeds PJ, et al. Nutrient-independent and nutrient-dependent factors stimulate protein synthesis in colostrum-fed newborn pigs. *Pediatric research*. 1995; 37(5):593–9. Epub 1995/05/01. <https://doi.org/10.1203/00006450-199505000-00006> PMID: 7603776.
12. Al Masri S, Hunigen H, Al Aiyani A, Rieger J, Zentek J, Richardson K, et al. Influence of age at weaning and feeding regimes on the postnatal morphology of the porcine small intestine. *Journal of Swine Health and Production*. 2015; 23(4):186–203. WOS:000357067000004.
13. Barszcz M, Skomiał J. The development of the small intestine of piglets—Chosen aspects. *Journal of animal and feed sciences*. 2011; 20:3–15. <https://doi.org/10.22358/jafs/66152/2011>.
14. Wang J, Zeng L, Li G, Huang B, Xiong X, Li F, et al. Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning periods. *Journal of animal science and biotechnology*. 2016; 7. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0063-2> PMID: 26819706.
15. Everaert N, Van Cruchten S, Westrom B, Bailey M, Van Ginneken C, Thymann T, et al. A review on early gut maturation and colonization in pigs, including biological and dietary factors affecting gut homeostasis. *Animal feed science and technology*. 2017; 233:89–103. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.011> WOS:000418629000010.
16. Zhu Y, Wang W, Yuan T, Fu L, Zhou L, Lin G, et al. MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2017; 312(5):G434–G42. Epub 2017/03/11. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00020.2017> PMID: 28280141.
17. Wang X, Zhu Y, Feng C, Lin G, Wu G, Li D, et al. Innate differences and colostrum-induced alterations of jejunal mucosal proteins in piglets with intra-uterine growth restriction. *The British journal of nutrition*. 2018; 119(7):734–47. Epub 2018/03/24. <https://doi.org/10.1017/S0007114518000375> PMID: 29569542.

18. Ferenc K, Pilzys T, Skrzypek T, Garbicz D, Marcinkowski M, Dylewska M, et al. Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. *Disease markers*. 2017; 2017:5238134. Epub 2017/08/02. <https://doi.org/10.1155/2017/5238134> PMID: 28757676; PubMed Central PMCID: PMC5516756.
19. De Vos M, Huygelen V, Willemen S, Fransen E, Casteleyn C, Van Cruchten S, et al. Artificial rearing of piglets: effects on small intestinal morphology and digestion capacity. *Livestock science*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.012>.
20. Støy AC, Heegaard PM, Thymann T, Bjerre M, Skovgaard K, Boye M, et al. Bovine colostrum improves intestinal function following formula-induced gut inflammation in preterm pigs. *Clinical nutrition: official journal of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2014; 33(2):322–9. Epub 2013/06/ 25. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.05.013> PMID: 23791159.
21. Pieper R, Scharek-Tedin L, Zetsche A, Rohe I, Kroger S, Vahjen W, et al. Bovine milk-based formula leads to early maturation-like morphological, immunological, and functional changes in the jejunum of neonatal piglets. *Journal of animal science*. 2016; 94(3):989–99. Epub 2016/04/12. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9942> PMID: 27065261.
22. Che L, Hu L, Liu Y, Yan C, Peng X, Xu Q, et al. Dietary Nucleotides Supplementation Improves the Intestinal Development and Immune Function of Neonates with Intra-Uterine Growth Restriction in a Pig Model. *Plos One*. 2016; 11(6):e0157314. Epub 2016/06/16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157314> PMID: 27304828; PubMed Central PMCID: PMC4909294.
23. Zhou H, Yu B, Sun J, Liu Z, Chen H, Ge L, et al. Short-chain fatty acids can improve lipid and glucose metabolism independently of the pig gut microbiota. *Journal of animal science and biotechnology*. 2021; 12(1):61. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00581-3> PMID: 33952344.
24. Getty CM, Almeida FN, Baratta AA, Dilger RN. Plasma metabolomics indicates metabolic perturbations in low birth weight piglets supplemented with arginine. *Journal of animal science*. 2015; 93(12):5754– 63. Epub 2015/12/08. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9293> PMID: 26641185.
25. Wu G, Knabe DA. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. *The Journal of nutrition*. 1994; 124(3):415–24. Epub 1994/03/01. <https://doi.org/10.1093/jn/124.3.415> PMID: 8120661.
26. Darcy-Vrillon B, Posho L, Morel MT, Bernard F, Blachier F, Meslin JC, et al. Glucose, galactose, and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during development.

- Pediatric research. 1994; 36 (2):175–81. Epub 1994/08/01. <https://doi.org/10.1203/00006450-199408000-00007> PMID: 7970931.
27. Wu G, Knabe DA, Yan W, Flynn NE. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. *The American journal of physiology*. 1995; 268(2 Pt 2):R334–42. Epub 1995/02/01. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.268.2.R334> PMID: 7864226.
28. He W, Hou Y, Wu G. 253 Glutamate and glutamine are the major metabolic fuels in enterocytes of suckling piglets. *Journal of animal science*. 2019; 97(Supplement_3):68–. <https://doi.org/10.1093/jas/skz258.141>.
29. Ji FJ, Wang LX, Yang HS, Hu A, Yin YL. Review: The roles and functions of glutamine on intestinal health and performance of weaning pigs. *Animal: an international journal of animal bioscience*. 2019; 13 (11):2727–35. Epub 2019/08/14. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001800> PMID: 31407650.
30. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*. 2009; 37(1):1–17. Epub 2009/ 03/21. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0> PMID: 19301095.
31. De´chelotte P, Darmaun D, Rongier M, Hecketsweiler B, Rigal O, Desjeux JF. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *The American journal of physiology*. 1991; 260(5 Pt 1):G677–82. Epub 1991/05/01. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1991.260.5.G677> PMID: 1903599.
32. Windmueller HG, editor *Metabolism of Vascular and Luminal Glutamine by Intestinal Mucosa in Vivo. Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues*; 1984 1984//; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. PMID: 6427215.
33. Cabrera RA, Usry JL, Arrellano C, Nogueira ET, Kutschenko M, Moeser AJ, et al. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets. *Journal of animal science and biotechnology*. 2013; 4(1):29. Epub 2013/08/07. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-29> PMID: 23916292; PubMed Central PMCID: PMC3765720.
34. Wang JJ, Chen LX, Li P, Li XL, Zhou HJ, Wang FL, et al. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *The Journal of nutrition*. 2008; 138(6):1025– 32. WOS:000255920900007. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1025> PMID: 18492829.
35. Wu G, Meier SA, Knabe DA. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *The Journal of nutrition*. 1996; 126(10):2578–84. Epub 1996/10/01. <https://doi.org/10.1093/jn/126.10.2578> PMID: 8857520.
-

36. Duttlinger AW, Kpodo KR, Lay DC, Richert BT, Johnson JS. Replacing dietary antibiotics with 0.20% L- glutamine in swine nursery diets: impact on health and productivity of pigs following weaning and transport. *Journal of animal science*. 2019; 97(5):2035–52. Epub 2019/03/30. <https://doi.org/10.1093/jas/skz098> PMID: 30924491; PubMed Central PMCID: PMC6488329.
37. He Y, Fan X, Liu N, Song Q, Kou J, Shi Y, et al. L-Glutamine Represses the Unfolded Protein Response in the Small Intestine of Weanling Piglets. *The Journal of nutrition*. 2019; 149(11):1904–10. Epub 2019/ 07/25. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz155> PMID: 31334766.
38. Haynes TE, Li P, Li X, Shimotori K, Sato H, Flynn NE, et al. L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant- or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes. *Amino acids*. 2009; 37(1):131–42. Epub 2009/02/04. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0243-x> PMID: 19189199.
39. Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Knabe DA, Burghardt RC, Spencer TE, et al. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *Journal of animal science*. 2011; 89(7):2017–30. Epub 2010/12/21. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3614> PMID: 21169511.
40. Manso HE, Filho HC, de Carvalho LE, Kutschenko M, Nogueira ET, Watford M. Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts. *J Anim Sci Biotechnol*. 2012; 3(1):2. Epub 2012/09/11. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-2> PMID: 22958708; PubMed Central PMCID: PMC3415122.
41. Rehfeldt C, Lang IS, Gors S, Hennig U, Kalbe C, Stabenow B, et al. Limited and excess dietary protein during gestation affects growth and compositional traits in gilts and impairs offspring fetal growth. *Journal of animal science*. 2011; 89(2):329–41. Epub 2010/10/05. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2970> PMID: 20889684.
42. Li Z, Sciascia QL, Gors S, Nguyen N, Rayatdoost Baghal F, Schregel J, et al. Glutamine supplementation moderately affects growth, plasma metabolite and free amino acid patterns in neonatal low birthweight piglets. *The British journal of nutrition*. 2022:1–32. Epub 2022/02/11. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000459> PMID: 35144703.
43. Mulisch M, Aescht E, Buchl-Zimmermann S, Burmester A, Dahnhardt-Pfeiffer S, Desel C, et al. *Romeis Mikroskopische Technik* 2010.
44. Liu P, Pieper R, Rieger J, Vahjen W, Davin R, Plendl J, et al. Effect of Dietary Zinc Oxide on Morphological Characteristics, Mucin Composition and Gene Expression in the Colon of Weaned Piglets. *Plos One*. 2014; 9(3). ARTN e91091 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091091> WOS:000332485800100. PMID: 24609095.

45. Luise D, Bertocchi M, Motta V, Salvarani C, Bosi P, Luppi A, et al. Bacillus sp. probiotic supplementation diminish the Escherichia coli F4ac infection in susceptible weaned pigs by influencing the intestinal immune response, intestinal microbiota and blood metabolomics. *Journal of animal science and biotechnology*. 2019; 10(1). ARTN 74 <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0380-3> WOS:000485251600001. PMID: 31528339.
46. Waly N, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ. The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *Journal of comparative pathology*. 2001; 124(2–3):172–82. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0450> WOS:000167132700012. PMID: 11222015.
47. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *Journal of comparative pathology*. 1999; 120(2):129–45. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0262> WOS:000078448800002. PMID: 10087487.
48. Ferrara F, Tedin L, Pieper R, Meyer W, Zentek J. Influence of medium-chain fatty acids and short-chain organic acids on jejunal morphology and intra-epithelial immune cells in weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2017; 101(3):531–40. <https://doi.org/10.1111/jpn.12490> WOS:000401162800016. PMID: 26919402.
49. Hornickel IN, Kacza J, Schnapper A, Beyerbach M, Schoennagel B, Seeger J, et al. Demonstration of substances of innate immunity in the esophageal epithelium of domesticated mammals. Part I—Methods and evaluation of comparative fixation. *Acta histochemica*. 2011; 113(2):163–74. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.09.009> WOS:000288888900013. PMID: 19850328.
50. Nebendahl C, Kruger R, Gors S, Albrecht E, Martens K, Hennig S, et al. Effects on transcriptional regulation and lipid droplet characteristics in the liver of female juvenile pigs after early postnatal feed restriction and refeeding are dependent on birth weight. *Plos One*. 2013; 8(11):e76705. Epub 2013/11/22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076705> PMID: 24260100; PubMed Central PMCID: PMC3834034.
51. Tsao M, Otter DE. Quantification of glutamine in proteins and peptides using enzymatic hydrolysis and reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 1999; 269(1):143–8. Epub 1999/03/30. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3091> PMID: 10094785.
52. Kuhla B, Kucia M, Gors S, Albrecht D, Langhammer M, Kuhla S, et al. Effect of a high-protein diet on food intake and liver metabolism during pregnancy, lactation and after weaning in mice. *Proteomics*. 2010; 10(14):2573–88. Epub 2010/04/28. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900789> PMID: 20422639.

53. Sciascia Q, Pacheco D, McCoard SA. Increased milk protein synthesis in response to exogenous growth hormone is associated with changes in mechanistic (mammalian) target of rapamycin (mTOR) C1-dependent and independent cell signaling. *Journal of dairy science*. 2013; 96(4):2327–38. Epub 2013/03/07. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6267> PMID: 23462168.
54. Danicke S, Goyarts T, Doll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G. Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. *Toxicology letters*. 2006; 165(3):297–311. Epub 2006/07/04. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.05.006> PMID: 16814494.
55. Rasch I, Gors S, Tuchscherer A, Htoo JK, Kuhla B, Metges CC. Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by DL-2-hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Increases Remethylation and Decreases Transsulfuration in Weaned Piglets. *The Journal of nutrition*. 2019; 149(3):432–40. Epub 2019/02/17. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy296> PMID: 30770540; PubMed Central PMCID: PMC6398387.
56. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*. 2003; 339(1):62–6. Epub 2003/03/06. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01423-4) PMID: 12618301.
57. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009; 55 (4):611–22. Epub 2009/02/28. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> PMID: 19246619.
58. Rohart F, Gautier B, Singh A, KA LC. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*. 2017; 13(11):e1005752. Epub 2017/11/04. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752> PMID:
59. Bevilacqua M, Bro R. Can We Trust Score Plots? *Metabolites*. 2020; 10(7). Epub 2020/07/12. <https://doi.org/10.3390/metabo10070278> PMID: 32650451; PubMed Central PMCID: PMC7408101.
60. Torchiano M. Effsize—a package for efficient effect size computation. 2020.
61. Storey JD BA, Dabney A, Robinson D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R package version 2.24.0. 2021.
62. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995; 57(1):289–300.

63. Li T, Huang S, Lei L, Tao S, Xiong Y, Wu G, et al. Intrauterine growth restriction alters nutrient metabolism in the intestine of porcine offspring. *Journal of animal science and biotechnology*. 2021; 12(1):15. Epub 2021/02/09. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00538-y> PMID: 33550986; PubMed Central PMCID: PMC7869197.
64. Morise A, Louveau I, Le Huerou-Luron I. Growth and development of adipose tissue and gut and related endocrine status during early growth in the pig: impact of low birth weight. *Animal: an international journal of animal bioscience*. 2008; 2(1):73–83. Epub 2008/01/01. <https://doi.org/10.1017/S175173110700095X> PMID: 22444965.
65. Zhang J, Wu G, Shan A, Han Y, Jin Y, Fang H, et al. Dietary glutamine supplementation enhances expression of ZO-1 and occludin and promotes intestinal development in Min piglets. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A–Animal Science*. 2017; 67:1–7. <https://doi.org/10.1080/09064702.2017.1333133>.
66. Xi PB, Jiang ZY, Dai ZL, Li XL, Yao K, Zheng CT, et al. Regulation of protein turnover by L-glutamine in porcine intestinal epithelial cells. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012; 23(8):1012–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.009> WOS:000306880100021. PMID: 22000664.
67. Yi D, Hou Y, Wang L, Ouyang W, Long M, Zhao D, et al. L-Glutamine enhances enterocyte growth via activation of the mTOR signaling pathway independently of AMPK. *Amino Acids*. 2015; 47(1):65–78. Epub 2014/10/05. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1842-8> PMID: 25280462.
68. Bertolo RF, Pencharz PB, Ball RO. A comparison of parenteral and enteral feeding in neonatal piglets, including an assessment of the utilization of a glutamine-rich, pediatric elemental diet. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 1999; 23(2):47–55.
69. Jiang Q, Chen J, Liu S, Liu G, Yao K, Yin Y. I-Glutamine Attenuates Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress by Activating the IRE1 α -XBP1 Axis in IPEC-J2: A Novel Mechanism of I-Glutamine in Promoting Intestinal Health. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(12). Epub 2017/12/06. <https://doi.org/10.3390/ijms18122617> PMID: 29206200; PubMed Central PMCID: PMC5751220.
70. Wang J, Wang N, Qi M, Li J, Tan B. Glutamine, glutamate, and aspartate differently modulate energy homeostasis of small intestine under normal or low energy status in piglets. *Animal nutrition*. 2022; 8 (1):216–26. Epub 2022/01/04. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.009> PMID: 34977390; PubMed Central PMCID: PMC8685906.

71. Hsu CB, Lee JW, Huang HJ, Wang CH, Lee TT, Yen HT, et al. Effects of supplemental glutamine on growth performance, plasma parameters and LPS-induced immune response of weaned barrows after castration. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2012; 25(5):674–81. Epub 2012/05/01. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11359> PMID: 25049613; PubMed Central PMCID: PMC4093117.
72. Yi GF, Carroll JA, Allee GL, Gaines AM, Kendall DC, Usry JL, et al. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of *Escherichia coli* K88+-challenged weaned pigs. *Journal of animal science*. 2005; 83(3):634–43. Epub 2005/02/12. <https://doi.org/10.2527/2005.833634x> PMID: 15705760.
73. Yoo SS, Field CJ, McBurney MI. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. *The Journal of nutrition*. 1997; 127(11):2253–9. Epub 1997/11/14. <https://doi.org/10.1093/jn/127.11.2253> PMID: 9349855.
74. Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*. 2018; 10(11). Epub 2018/10/ 27. <https://doi.org/10.3390/nu10111564> PMID: 30360490; PubMed Central PMCID: PMC6266414.
75. Zhao Y, Albrecht E, Sciascia QL, Li Z, Goers S, Schregel J, et al. Effects of Oral Glutamine Supplementation on Early Postnatal Muscle Morphology in Low and Normal Birth Weight Piglets. *Animals: an open access journal from MDPI* 2020; 10(11). Epub 2020/11/01. <https://doi.org/10.3390/ani10111976> PMID: 33126436.
76. Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *The Journal of nutrition*. 1998; 128(3):606–14. Epub 1998/04/04. <https://doi.org/10.1093/jn/128.3.606> PMID: 9482771.
77. Huygelen V, De Vos M, Prims S, Vergauwen H, Franssen E, Casteleyn C, et al. Birth weight has no influence on the morphology, digestive capacity and motility of the small intestine in suckling pigs. *Livestock science*. 2015; 182:129–36. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.003> WOS:000366776500020.
78. Xu RJ, Mellor DJ, Birtles MJ, Reynolds GW, Simpson HV. Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1994; 18(2):231–40. Epub 1994/02/01. <https://doi.org/10.1097/00005176-199402000-00018> PMID: 8014773.

79. Wang W, Degroote J, Van Ginneken C, Van Poucke M, Vergauwen H, Dam TM, et al. Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016; 30(2):863–73. Epub 2015/10/31. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274779> PMID: 26514167.
80. Chen J, Song Y, Chen D, Yu B, He J, Mao X, et al. Low Birth Weight Disturbs the Intestinal Redox Status and Mitochondrial Morphology and Functions in Newborn Piglets. *Animals: an open access journal from MDPI*. 2021; 11(9): 2561. <https://doi.org/10.3390/ani11092561> PMID: 34573527.
81. Wiyaporn M, Thongsong B, Kalandakanond-Thongsong S. Growth and small intestine histomorphology of low and normal birth weight piglets during the early suckling period. *Livestock science*. 2013; 158(1– 3):215–22. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.10.016> WOS:000328719800026.
82. Thongsong B, Wiyaporn M, Kalandakanond-Thongsong S. Blood glucose, amino acid profiles and nutrient transporter gene expressions in the small intestine of low and normal birthweight piglets during the early suckling period. *The Veterinary Journal*. 2019; 247:1–7. Epub 2019/04/12. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.006> PMID: 30971346.
83. Wang Q, Xiong X, Wang X, Tu Q, Li J, Ding X, et al. Suckling Piglet Intestinal Enterocyte Nutrient Metabolism Changes. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018; 48(5):2103–13. Epub 2018/08/15. <https://doi.org/10.1159/000492552> PMID: 30107371.
84. Buddington RK, Elnif J, Puchal-Gardiner AA, Sangild PT. Intestinal apical amino acid absorption during development of the pig. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2001; 280(1):R241–7. Epub 2000/12/22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.1.R241> PMID: 11124157.
85. Hampson DJ. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in veterinary science*. 1986; 40(1):32–40. Epub 1986/01/01. PMID: 3704321.
86. Van Ginneken C, Van Meir F, Weyns A. Stereologic characteristics of pig small intestine during normal development. *Digestive diseases and sciences*. 2002; 47(4):868–78. Epub 2002/05/07. <https://doi.org/10.1023/a:1014768806773> PMID: 11991623.
87. Levine UY, Looft T, Allen HK, Stanton TB. Butyrate-producing bacteria, including mucin degraders, from the swine intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*. 2013; 79(12):3879–81. Epub 2013/04/16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00589-13> PMID: 23584773; PubMed Central PMCID: PMC3675948.

88. Forder RE, Howarth GS, Tivey DR, Hughes RJ. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poultry science*. 2007; 86(11):2396–403. Epub 2007/10/24. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00222> PMID: 17954591.
89. Burkey TE, Skjolaas KA, Minton JE. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. *Journal of animal science*. 2009; 87(4):1493–501. Epub 2008/11/26. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1330> PMID: 19028849.
90. Rothkotter HJ, Ulbrich H, Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatric research*. 1991; 29(3):237–42. Epub 1991/03/01. <https://doi.org/10.1203/00006450-199103000-00004> PMID: 2034471.
91. Butler JE, Klobasa F, Werhahn E. The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1981; 2(1):53–65. Epub 1981/02/01. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(81\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0165-2427(81)90038-6) PMID: 7046208.
92. Allen WD, Porter P. The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissues of the young unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity. *Immunology*. 1973; 24(3):493–501. Epub 1973/03/01. PMID: 4574577; PubMed Central PMCID: PMC1422984.
93. Collinder E, Cardona ME, Kozakova H, Norin E, Stern S, Midtvedt T. Biochemical intestinal parameters in pigs reared outdoors and indoors, and in germ-free pigs. *Journal of veterinary medicine A, Physiology, pathology, clinical medicine*. 2002; 49(4):203–9. Epub 2002/06/19. <https://doi.org/10.1046/j.14390442.2002.00407.x> PMID: 12069263.
94. Hedemann MS, Eskildsen M, Laerke HN, Pedersen C, Lindberg JE, Laurinen P, et al. Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *Journal of animal science*. 2006; 84(6):1375–86. WOS:000237673300010. <https://doi.org/10.2527/2006.8461375x> PMID: 16699094.
95. Arnaud AP, Rome V, Richard M, Formal M, David-Le Gall S, Boudry G. Post-natal co-development of the microbiota and gut barrier function follows different paths in the small and large intestine in piglets. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020; 34(1):1430–46. Epub 2020/01/10. <https://doi.org/10.1096/fj.201902514R> PMID: 31914707.

96. Higashiguchi T, Hasselgren PO, Wagner K, Fischer JE. Effect of Glutamine on Protein-Synthesis in Isolated Intestinal Epithelial-Cells. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 1993; 17(4):307–14. <https://doi.org/10.1177/0148607193017004307> WOS:A1993LY58000002. PMID: 8271353.
97. Godlewski MM, Slupecka M, Wolinski J, Skrzypek T, Skrzypek H, Motyl T, et al. Into the unknown—the death pathways in the neonatal gut epithelium. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2005; 56 Suppl 3:7–24. Epub 2005/08/04. PMID: 16077193.
98. Yin J, Ren W, Liu G, Duan J, Yang G, Wu L, et al. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets. *Free radical research*. 2013; 47. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.848277> PMID: 24074241.
99. McElroy MC, Postle AD, Kelly FJ. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development. *Biochimica et biophysica acta General subjects*. 1992; 1117(2):153–8. Epub 1992/09/15. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(92\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(92)90073-4) PMID: 1525175.

3.10. Supplementary material

S1 File. Supplementation procedure

The method used to supplement the piglets is suitable for experimental purposes only but ensures that the complete daily dose is ingested. The calculated respective amino acid amounts of supplemental amino acids were weighed into pre-weighed disposable syringes and amino acids were dissolved by adding 2 ml of water. Two trained staff members performed the supplementation. One of the two performed the supplementation while the other gently restrained the pig. The conus of the syringe was placed close to the basis of the pig's tongue and the amino acid solution fluid was installed carefully squeezed out of the disposable syringe in the mouth of the piglet. The head of the animal was stretched gently to ensure that the introduced fluid was fully swallowed. Syringes were rinsed with 1 ml of water and the procedure of drenching was repeated as described (Li et al., 2022). During the study, emptied syringes were randomly collected, dried and weighed to determine if the amino acid dosage were completely given to the piglets. A previous study showed that drenching is not a stressful intervention for suckling piglets (Van Tichelen et al., 2021).

1. Li Z, Sciascia QL, Görs S, Nguyen N, Rayatdoost Baghal F, Schregel J, Tuchscherer A, Zentek J, Metges CC (2022): Glutamine supplementation moderately affects growth, plasma metabolite and free amino acid patterns in neonatal low birthweight piglets. *British Journal of Nutrition*: Feb 11;1-11. doi: 10.1017/S0007114522000459. Online ahead of print.
2. Van Tichelen K, Prims S, Ayuso M, Van Kerschaver C, Vandaele M, Degroote J, Van Cruchten S, Michiels J, Van Ginneken C (2021): Handling Associated with Drenching Does Not Impact Survival and General Health of Low Birth Weight Piglets. *Animals (Basel)*, 11. Doi: 10.3390/ani11020404.

S1 Table. Primer sequences

Process	Gene Name			Reference	Forward	Reverse	Product Size	Age	Efficiency	mean Cq
	Full	Abbreviated name	Ref Seq No.							
AA transporter	Solute Carrier Family 1 Member 4 Variant 1	SLC1A4 V1	XM_013996100.2	This study	ACGCAACCA GCTATGAAG AG	GGCTACTCC CAACACCAA G	137	5	1.831	24.1
								12	1.895	29.1
	Solute Carrier Family 1 Member 4	SLC1A4	XM_021087450.1	This study	AGCAGGACA GATTTTCAC CATC	CCACAGCCA GGATCAAAG AG	149	5	1.859	29.6
								12	1.851	29.9
	Solute Carrier Family 38 Member 3	SLC38A3	XM_003358448.4	This study	CTTCCTACA GAAAAGCCC CAG	CGTTGCTAA GGTTGAACA CTG	92	5	1.883	31.3
								12	1.860	32.0
	Solute Carrier Family 38 Member 4	SLC38A4	XM_021092580.1	This study	AGAGCATCA GTGGAGAAA GTG	TTGACTTTC AGCATCTTC GTTTG	104	5	1.913	33.0
								12	1.865	34.0
Solute-linked carrier family A1 member 5	SLC1A5	XM_003355984.4	This study	GACGTCCTA CTCGGAGAG G	ATGTTTCATG CCCTCCACC	78	5	1.877	28.8	
							12	1.903	29.8	
Solute Carrier Family 6 Member 19	SLC6A19	XM_003359855.4	Yang et al. (2016a)	CCGTTGATA AGCGTCAGG AT	CACAACAAC TGCGAGAAG GA	155	5	1.867	25.1	
							12	1.842	25.5	
Solute Carrier Family 7 Member 8	SLC7A8	XM_021099239.1	This study	AATCTTCGT CTCACCAA AGG	CATAACACA GGGCTCCTA CAG	110	5	1.842	24.8	
							12	1.815	26.7	
AA-metabolism/ Energy metabolism	Alanine aminotransferase	ALT	XM_013996392.2	This study	TGAAGGAGA AGGTGCTAA CG	CTCGGATGA CCTCAGTGA AG	150	5	1.776	32.5
								12	1.750	33.5
	Glutaminase	GLS	XM_021076054.1	This study	CAGTTTGAT GCATTCATG TGG	CCAGATTTT GCAGGAAGA CC	78	5	1.919	27.1
								12	1.870	24.2

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

	Aspartate aminotransferase 1	AST 1	NM_213927.1	This study	CTTGCCCTT GGAGATGAC AG	TCCATTGTA CCATCGTGC TAAG	120	5	1.718	28.0
								12	1.715	29.9
	Aspartate aminotransferase 2	AST 2	NM_213928.1	This study	TGGGTGAGA ACAATGAGG TG	TTTCGGCAG GAAGACATC TC	137	5	1.894	23.3
								12	1.875	24.8
	Glutamate dehydrogenase	GLUD1	NM_001244501.2	This study	TCCTGGGAG GTTATCGAG G	ACTTCATCT ACGCTCACA TCAG	101	5	1.686	29.5
	N-acetylglutamate synthase	NAGS	NM_001097520.1	This study	ACTCTGTCT ACGTCTCTG AGG	CCACAAACT TGTCTAGAT ACGGG	93	5	1.852	27.9
								12	1.859	28.9
	26S protease regulatory subunit 6A	PSMC3	XM_005660922.3	This study	GCAAGTGTG CAGTGATCA AAA	TCTTTGTTCA CACCCACCA A	112	5	1.929	24.4
								12	1.887	25.9
	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	SDHA	XM_021076931.1	Feng et al. (2010)	GCGGACAGA GCCTCAAGT T	CAGGAGATC CAAGGCAAA AT	155	5	1.822	25.2
								12	1.842	25.9
	Oxidative stress + Glutathione metabolism	Cystathionine-gamma-Lyase	CGL	NM_001044585.1	This study	CTTCATAGT AGGCTCCGT TT	ACTGAGCAA CTGCCATT CA	142	5	1.932
								12	1.893	26.2
Glutamate cysteine ligase		GCL	XM_021098556.1	Rasch et al. (2019a)	TGATCCCA TCCTGAACT CT	CGGATGGTT TGCGATAAA CT	155	5	1.892	25.4
								12	1.900	26.4
Copper dependent superoxide dismutase		CuSOD	NM_001190422.1	This study	GAGACCTGG GCAATGTGA CT	CTGCCCAAG TCATCTGGT TT	139	5	1.905	23.1
								12	1.901	22.4
Gamma-Glutamyl-Transferase	GGT	XM_021072100.1	Rasch et al. (2019a)	CAAAGGGTA CAACTTCTC C	AGCCAAAGT AGAGGTTGA T	338	5	1.847	24.7	
							12	1.844	25.8	
Glutathione peroxidase 1	GPX1	NM_214201.1	This study	GGGACTACA CCCAGATGA ATG	CTGATGTCC AAACTGGTT GC	92	5	1.775	22.5	
							12	1.817	28.1	

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

	Glutathione peroxidase 2	GPX2	NM_001115136.1	This study	GTGGTTCTT GGCTTCCT T	CGTACTTGA GGCTGTTCA GG	82	5	1.845	21.8	
								12	1.905	25.5	
	Glutathione peroxidase 4	GPX4	NM_214407.1	This study	ACGAATTCT CAGCCAAGG AC	CTCATTGAG AGGCCACAT TG	96	5	1.700	25.4	
	Glutathione-disulfide Reductase	GSR1	XM_003483635.4	This study	TGGAGAATG CTGGCATAG AG	GGGTTTCCT ACCAGGAAC TG	110	5	1.907	24.7	
								12	1.883	26.3	
	Glutathione synthetase	GSS	NM_001244625.1	Rasch et al. (2019a)	GTGCTCAAG CCCCAGAGA	ATGAGGCTC TCTCCTCAC TGTC	100	5	1.932	27.3	
								12	1.914	28.1	
	Glutathione S-transferases	GSTA	NM_213850.2	This study	CCGTTATCT TCCTGCATT TG	GTCAGCCCT GCTCAGCTT	82	5	1.930	22.7	
								12	1.890	22.7	
	Heat Shock Protein 90kDa Alpha	HSPCB	XM_005666063.2	This study	AGATCACCT GGCAGTCAA GC	CCGCGGATG AAGTTGAGG TA	198	5	1.889	22.4	
								12	1.907	18.5	
	Reference gene	Peptidylprolyl isomerase A	PPIA	NM_214353	Rasch et al. (2019a)	AGCACTGGG GAGAAAGGA TT	AAAAC TGGG AACC GTTTG TG	220	5	1.895	18.7
									12	1.895	21.3
Ribosomal protein S18		RPS 18	NM_213940.1	Rasch et al. (2019a)	GGATGTGAA GGATGGGAA GTACA	TCCAAGTCT TCACGGAGT TTGTT	72	5	1.887	22.8	
								12	1.887	21.0	
Actin beta		ACTB	XM_021086047.1	Nygard et al. (2007)	CACGCCATC CTGCGTCTG GA	AGCACCGTG TTGGCGTAG AG	100	5	1.915	18.6	
								12	1.740	25.8	
Topoisomerase 2-beta		TOP2B	NM_001258386.1	This study	CCCAGTTGG CTGGATCTG TT	ATAACGAGG GCTTGCAGC AT	182	5	1.907	25.9	
								12	1.901	25.5	

S1 Table References

1. Yang C, Yang X, Lackeyram D, Rideout TC, Wang Z, Stoll B, et al. Expression of apical Na(+)-L-glutamine co-transport activity, B(0)-system neutral amino acid co-transporter (B(0)AT1) and angiotensin-converting enzyme 2 along the jejunal crypt-villus axis in young pigs fed a liquid formula. *Amino acids*. 2016;48(6):1491-508.
2. Feng XT, Xiong YZ, Qian H, Lei MG, Xu DQ, Ren ZQ. Selection of reference genes for gene expression studies in porcine skeletal muscle using SYBR green qPCR. *J Biotechnol*. 2010;150(3):288-93.
3. Rasch I, Gors S, Tuchscherer A, Htoo JK, Kuhla B, Metges CC. Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by DL-2-hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Increases Remethylation and Decreases Transsulfuration in Weaned Piglets. *J Nutr*. 2019;149(3):432-40.
4. Nygard AB, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol*. 2007;8:67.

S2 Table. Number of jejunal IgA positive cells in low and normal birth weight male suckling piglets

Item	Age ² (d)	Ala		Gln		SE	<i>P</i> values ¹
		LBW	NBW	LBW	NBW		Suppl
Area1	12	0.33	0.17	0.00	0.83	0.19	0.281
Area2	12	0.83	0.33	0.83	0.17	0.15	0.586
Area3	12	9.83	10.1	8.25	8.92	0.68	0.048

Values are LSM ± SE of IgA positive cells per 10000 µm² of Lamina propria, the largest SE is shown; n = 12/group (5, 12 d).

¹ANOVA F test. None of the other fixed factors (BiW or Age) nor the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant (*P* > 0.05).

² IgA positive cells not detectable on day 5.

Abbreviations: Area1 = villus; Area2 = end of villus/crypt mouth; Area 3 = Area beside the crypt region.

S3 Table. Jejunal villi intraepithelial CD3 positive cells from suckling low and normal birth weight male piglets

Item	Age (d)	Ala		Gln		SE
		LBW	NBW	LBW	NBW	
CD3	5	5.50	5.45	6.30	5.90	0.50
	12	6.57	6.27	6.33	6.76	0.52

Values are LSM ± SE of CD3 positive cells per 10000 µm² of Lamina propria, the largest SE is shown; n = 12/group (5, 12d).

ANOVA F test. None of the fixed factors (Suppl, BiW or Age) or the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant (*P* > 0.05).

S4 Table. Concentrations of jejunal free amino acids in suckling low and normal birth weight male piglets

Item	Age (d)	Ala		Gln		SE	<i>P</i> values ¹	
		LBW	NBW	LBW	NBW		Age	BiW*Suppl*Age
IAA, $\mu\text{mol/g}$ (fresh matter)								
Arg	5	2.70	2.02	2.42	2.65	0.30	0.003	0.081
	12	1.62	1.79	2.02	1.86	0.31		
His	5	1.07 ^e	0.82	1.00	1.10	0.10	0.001	0.050
	12	0.59 ^f	0.66	0.75	0.70	0.10		
Ile	5	1.53 ^e	1.15	1.41	1.56	0.15	0.001	0.047
	12	0.81 ^f	0.90	1.04	0.92	0.16		
Leu	5	3.51	2.59	3.18	3.55	0.38	0.01	0.057
	12	2.01	2.23	2.55	2.28	0.39		
Lys	5	3.00	2.18	2.60	2.99	0.33	0.051	0.056
	12	1.82	2.01	2.34	2.18	0.34		
Met	5	1.17	0.91	1.07	1.19	0.12	0.004	0.049
	12	0.67	0.75	0.83	0.74	0.12		
Phe	5	1.94	1.61	1.87	2.03	0.18	0.005	0.088
	12	1.25	1.37	1.46	1.31	0.19		
Thr	5	2.57 ^e	1.95	2.28	2.59	0.25	0.003	0.040
	12	1.44 ^f	1.57	1.79	1.64	0.25		
Trp	5	0.46	0.37	0.42	0.46	0.04	0.016	0.060
	12	0.30	0.33	0.37	0.34	0.04		
Val	5	2.53	1.87	2.25	2.53	0.26	0.006	0.037
	12	1.39	1.56	1.83	1.63	0.26		
BCAA	5	7.58	5.60	6.84	7.63	0.79	0.005	0.047
	12	4.21	4.69	5.42	4.83	0.81		
Total IAA	5	20.5	15.5	18.5	20.6	2.09	0.008	0.053
	12	11.9	13.2	15.0	13.6	2.14		

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

DAA, $\mu\text{mol/g}$ (fresh matter)									
Ala	5	7.16 ^e	5.97		6.32 ^e	6.62 ^e	0.46	<0.001	0.066
	12	3.89 ^f	4.17		4.11 ^f	3.71 ^f	0.47		
Asn	5	1.59	1.33		1.51	1.58	0.15	0.003	0.136
	12	0.94	1.01		1.17	1.08	0.15		
Asp	5	3.18	2.67		3.13	3.29 ^e	0.23	0.002	0.025
	12	2.24	2.55		2.53	2.23 ^f	0.23		
Cys	5	0.71 ^f	0.54 ^f		0.72 ^f	0.67 ^f	0.10	<0.001	0.256
	12	1.65 ^e	1.56 ^e		1.65 ^e	1.33 ^e	0.10		
Gln	5	2.90 ^e	2.30 ^b		3.06	3.33 ^{ea}	0.26	<0.001	0.036
	12	1.60 ^f	1.83		2.13	1.95 ^f	0.27		
Glu	5	8.78	8.06		9.70 ^e	9.02 ^e	0.53	<0.001	0.314
	12	6.68	7.28		7.37 ^f	6.70 ^f	0.54		
Gly	5	7.80	7.11 ^f		7.50 ^f	7.71	0.45	<0.001	0.259
	12	9.48	10.0 ^e		9.84 ^e	9.56	0.46		
Pro	5	9.14 ^e	7.27 ^e		8.36 ^e	8.37 ^e	0.62	<0.001	0.096
	12	2.47 ^f	2.83 ^f		3.34 ^f	2.91 ^f	0.62		
Ser	5	4.85 ^e	3.81		4.43	4.89 ^e	0.41	<0.001	0.044
	12	2.57 ^f	2.81		3.15	2.87 ^f	0.42		
Tyr	5	1.82	1.46		1.72	1.82	0.17	0.010	0.092
	12	1.19	1.31		1.40	1.27	0.17		
Total DAA	5	48.0	40.7		46.4	47.3 ^e	2.88	<0.001	0.062
	12	32.7	35.3		36.7	33.6 ^f	2.92		
Total AA	5	74.3	62.1		70.7	73.9	5.04	0.003	0.051
	12	52.7	57.2		60.3	55.2	5.13		

Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; $n = 12/\text{group}$ (5, 12 d). Only AA affected by AA supplementation, BiW or age are shown.

^{a,b} Labeled LSM in a row within one BiW group and one age-group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{e,f} Labeled LSM in a column within one combined Suppl - BiW group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

¹ANOVA F test. BiW affected Cys ($P < 0.05$), Suppl affected Gln ($P < 0.05$); none of the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age or BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

Abbreviations: AA, Amino acids; BCAA, Branched-chain amino acids; DAA, Dispensable amino acids; IAA, Indispensable amino acids.

S5 Table. Jejunal amino metabolites from suckling low and normal birth weight male piglets

Item	Age (d)	Ala		Gln			P values ¹	
		LBW	NBW	LBW	NBW	SE	Age	BiW*Suppl*Age
Amino metabolites, $\mu\text{mol/g}$ (fresh matter)								
3-MH	5	0.010	0.008	0.012 ^e	0.010	0.001	0.002	0.993
	12	0.005	0.005	0.006 ^f	0.006	0.001		
Aad	5	0.225 ^e	0.171	0.196 ^e	0.238 ^e	0.022	<0.001	0.013
	12	0.081 ^f	0.079	0.092 ^f	0.081 ^f	0.023		
Abu	5	0.021	0.021	0.026	0.023	0.005	0.008	0.953
	12	0.035	0.031	0.036	0.029	0.005		
β -Alanine	5	0.076 ^e	0.069	0.087 ^e	0.082 ^e	0.006	<0.001	0.818
	12	0.047 ^f	0.048	0.045 ^f	0.044 ^f	0.006		
Car	5	0.000 ^e	0.000 ^e	0.000 ^e	0.000 ^e	0.002	<0.001	0.691
	12	0.027 ^f	0.029 ^f	0.027 ^f	0.026 ^f	0.002		
Cit	5	0.173	0.200	0.188	0.232	0.022	0.644	0.273
	12	0.192	0.207	0.230	0.201	0.023		
GABA	5	0.120	0.125	0.135	0.125	0.012	0.008	0.687
	12	0.098	0.097	0.115	0.086	0.012		
Hyp	5	0.503 ^e	0.557 ^e	0.561 ^e	0.480 ^e	0.046	<0.001	0.375
	12	0.257 ^f	0.283 ^f	0.273 ^f	0.266 ^f	0.047		
Orn	5	0.062	0.061	0.067	0.083	0.010	0.478	0.239
	12	0.080	0.080	0.074	0.063	0.010		
Tau	5	2.41	2.80	2.51	2.52	0.21	0.241	0.989
	12	2.60	2.82	2.89	2.72	0.21		

Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; $n = 12/\text{group}$ (5, 12 d). Only AA and metabolites which are affected by AA supplementation, BiW or age-groups are shown.

^{e,f}Labeled LSM in a column within one combined treatment - BiW group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

¹ANOVA F test. BiW x Suppl affected Aad ($P < 0.05$); none of the other fixed factors (Suppl or BiW) or the interactions of the fixed factors (Suppl x Age or BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

Abbreviations: 3-MH, 3 Methylhistidine; Aad, α -Amino adipate; Abu, α -Aminobutyric acid; Car, Carnosine; Cit, Citrulline; GABA, γ -Aminobutyric acid; Hyp, Hydroxyproline; Orn, Ornithine; Tau, Taurine.

S6 Table. Volcano plot of jejunal variables analysed between 5 and 12 day old suckling piglets

Variable Block	Item	Fold change [Cohen's d]	FDR
Jejunal tissue PB AA	Ala	1.08	< 0.001
	Asp	1.05	< 0.001
	Cys	1.23	< 0.001
	Ile	1.24	< 0.001
	Leu	1.01	< 0.001
	Lys	1.83	< 0.001
	Phe	1.04	< 0.001
	Thr	1.13	< 0.001
	Tyr	1.12	< 0.001
	Val	1.30	< 0.001
Jejunal tissue free AA	Cys	-1.74	< 0.001
	Pro	1.55	< 0.001
Jejunal tissue AA metabolites	Car	-1.62	< 0.001
	β-Ala	1.18	< 0.001
Jejunal tissue Biochemical indices	Protein	1.82	< 0.001

FC: fold change relative to 12 d age group. Values with a positive sign indicate that larger values are present in the 5 d group. Values with a negative sign indicate that the corresponding value is larger in the 12 d group.

P-values were calculated from Tukey Kramer test.

Tier 1 - Block of variables

Tier 2- Item name

Only items with both fold-change ≥ 1.0 or ≤ -1.0 and $FDR \leq 0.05$ are shown.

S7 Table. Jejunal protein bound amino acids from suckling low and normal birth weight male piglets at the age of 5 d and 12 d

Item	Age (d)	Ala			Gln		SE	P values ¹
		LBW	NBW		LBW	NBW		Age
IAA, $\mu\text{mol/g}$ (fresh matter)								
Arg	5	35.8 ^e	34.5		36.4	34.7 ^e	1.27	<0.001
	12	29.8 ^f	30.1		31.1	28.4 ^f	1.30	
His	5	15.1	14.6		15.6	14.7	0.54	0.001
	12	13.4	13.4		14.0	12.6	0.55	
Ile	5	36.5 ^e	34.7 ^e		37.6 ^e	35.5 ^e	1.19	0.049
	12	27.2 ^f	27.7 ^f		28.8 ^f	26.2 ^f	1.21	
Leu	5	65.0 ^e	61.8 ^e		66.5 ^e	63.1 ^e	2.19	<0.001
	12	50.3 ^f	51.6 ^f		53.4 ^f	49.2 ^f	2.23	
Lys	5	48.0 ^e	46.1 ^e		48.2 ^e	45.9 ^e	2.39	<0.001
	12	22.2 ^f	24.5 ^f		22.2 ^f	18.6 ^f	2.43	
Met	5	13.8 ^e	13.2		14.2 ^e	13.5 ^e	0.48	<0.001
	12	11.4 ^f	11.7		12.0 ^f	10.9 ^f	0.49	
Phe	5	27.6 ^e	26.1 ^e		28.2 ^e	26.8 ^e	0.94	<0.001
	12	21.1 ^f	21.6 ^f		22.4 ^f	20.6 ^f	0.96	
Thr	5	38.6 ^e	36.6 ^e		39.3 ^e	37.3 ^e	1.34	<0.001
	12	28.9 ^f	29.2 ^f		30.7 ^f	28.2 ^f	1.36	
Trp	5	8.21 ^e	7.61		8.24	7.94 ^e	0.31	<0.001
	12	6.65 ^f	6.79		7.10	6.58 ^f	0.31	
Val	5	49.2 ^e	46.6 ^e		50.2 ^e	47.7 ^e	1.62	<0.001
	12	35.8 ^f	36.5 ^f		38.1 ^f	34.8 ^f	1.64	
BCAA	5	151 ^e	143 ^e		154 ^e	146 ^e	4.97	<0.001
	12	113 ^f	116 ^f		120 ^f	110 ^f	5.05	
Total IAA	5	352 ^e	336 ^e		362 ^e	349 ^e	11.7	<0.001
	12	281 ^f	279 ^f		294 ^f	270 ^f	11.9	

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

DAA, $\mu\text{mol/g}$ (fresh matter)								
Ala	5	55.1 ^e	53.3 ^e		56.7 ^e	53.8 ^e	1.89	<0.001
	12	42.2 ^f	42.5 ^f		44.8 ^f	40.8 ^f	1.92	
Asn	5	24.4 ^e	23.4		25.2 ^e	23.4 ^e	0.85	<0.001
	12	19.8 ^f	20.1		20.8 ^f	19.0 ^f	0.87	
Asp	5	35.1 ^e	33.1 ^e		35.5 ^e	36.5 ^e	1.57	<0.001
	12	24.5 ^f	24.7 ^f		27.2 ^f	24.6 ^f	1.60	
Cys	5	8.63 ^e	7.48 ^e		8.63 ^e	8.15 ^e	0.48	<0.001
	12	4.55 ^f	4.63 ^f		5.22 ^f	5.05 ^f	0.49	
Gln	5	28.5	27.3		29.2	27.7	1.00	<0.001
	12	24.3	24.4		25.6	23.4	1.01	
Glu	5	50.8 ^e	48.3 ^e		51.4 ^e	49.7 ^e	1.84	<0.001
	12	38.5 ^f	39.5 ^f		41.5 ^f	38.0 ^f	1.87	
Gly	5	52.0	49.4		52.2	49.8 ^e	1.95	<0.001
	12	43.5	43.4		44.5	41.3 ^f	1.98	
Pro	5	26.0	25.3		31.4	31.2	2.43	0.173
	12	27.6	23.7		26.4	24.0	2.48	
Ser	5	48.1 ^e	45.7 ^e		48.7 ^e	46.5 ^e	1.74	<0.001
	12	38.0 ^f	38.0 ^f		39.6 ^f	36.9 ^f	1.77	
Tyr	5	23.3 ^e	22.0 ^e		23.7 ^e	22.5 ^e	0.82	<0.001
	12	17.4 ^f	17.4 ^f		18.4 ^f	16.9 ^f	0.83	
Total DAA	5	352 ^e	336 ^e		362 ^e	349 ^e	11.7	<0.001
	12	281 ^f	279 ^f		294 ^f	270 ^f	11.9	
Total AA	5	684 ^e	651 ^e		701 ^e	670 ^e	23.0	<0.001
	12	519 ^f	524 ^f		545 ^f	498 ^f	23.0	

Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; $n = 12/\text{group}$ (5, 12 d); Only AA and AA ratios which are affected by AA supplementation, BiW or age are shown.

^{e,f}Labeled LSM in a column between one Suppl - birth weight group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

¹ANOVA F test. BiW affected Asn, and Ile ($P < 0.05$); neither the other fixed factor (Suppl) nor the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

Abbreviations: AA, Amino acids; BCAA, Branched-chain amino acids; DAA, Dispensable amino acids IAA, Indispensable amino acids.

S8 Table. Jejunal digesta free amino acid concentrations from suckling low and normal birth weight male piglets

Item	Age (d)	Ala			Gln		SE	<i>P</i> values ¹
		LBW	NBW		LBW	NBW		Age
IAA, $\mu\text{mol/g}$ (DM jejunal digesta)								
Arg	5	15.9	13.5		16.5	20.3	2.95	0.063
	12	14.7	15.4		10.6	10.7	2.54	
His	5	7.99	5.69		6.40	9.14	1.72	0.291
	12	6.25	7.04		4.66	5.43	1.54	
Ile	5	14.3	10.3		12.8	18.4	2.97	0.100
	12	11.3	11.8		7.20	9.80	2.66	
Leu	5	29.9	22.1		26.9	38.8	5.92	0.134
	12	24.0	26.8		18.9	22.5	5.18	
Lys	5	44.2	33.1		35.4	47.2	8.22	0.975
	12	47.7	43.6		29.7	39.7	7.21	
Met	5	7.52	4.99		6.51	8.53	1.54	0.038
	12	4.55	4.75		3.20	3.81	1.40	
Phe	5	14.6	11.2		14.3	18.2	2.97	0.207
	12	12.5	14.1		9.36	11.0	2.63	
Thr	5	9.82	9.06		9.09	17.3	2.87	0.666
	12	11.1	12.6		7.42	10.5	2.54	
Trp	5	2.99	2.26		2.83	4.10	0.71	0.552
	12	2.93	3.32		2.23	2.42	0.63	
Val	5	12.0	11.7		12.4	23.1	3.92	0.602
	12	13.6	16.1		10.1	13.2	3.48	
BCAA	5	56.2	44.2		52.1	80.2	12.6	0.213
	12	49.0	54.8		36.2	45.5	11.2	
Total IAA	5	160	124		143	205	31.1	0.296
	12	149	156		103	129	27.4	

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

DAA, $\mu\text{mol/g}$ (DM jejunal digesta)								
Ala	5	22.6	20.2		18.5	30.5	4.65	0.437
	12	23.8	24.1		15.3	18.5	4.07	
Asn	5	7.88	6.69		6.46	12.1	2.04	0.490
	12	8.24	8.01		5.55	7.06	1.81	
Asp	5	8.41	8.38		8.12	19.4	3.03	0.351
	12	13.9	15.6		9.04	13.7	2.65	
Cys	5	2.19	2.06		0.761	2.96	0.648	0.15
	12	1.33	1.67		0.842	1.53	0.565	
Gln	5	27.6	20.7		24.7	31.7	5.42	0.066
	12	20.4	19.2		13.5	18.6	4.87	
Glu	5	30.0	24.2		21.5	47.0	7.16	0.761
	12	32.9	33.1		19.8	31.1	6.23	
Gly	5	14.8	18.0		15.1	27.0	5.47	0.104
	12	29.7	27.1		20.2	27.7	4.94	
Pro	5	19.2	18.0		18.9	29.1	5.70	0.343
	12	19.3	17.7		12.5	18.3	5.12	
Ser	5	12.2	13.4		11.2	23.0	3.75	0.706
	12	15.2	16.3		10.2	14.0	3.31	
Tyr	5	21.2	14.6		18.9	20.4	3.05	0.015
	12	14.2	14.2		10.1	12.2	2.72	
Total DAA	5	163	145		143	243	36.7	0.608
	12	179	177		118	163	32.7	
Total AA	5	333	277		295	461	69.8	0.506
	12	342	346		232	306	62.0	

Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; n = 12/group (5, 12 d). As the jejunum was not filled with digesta no further analysis were performed and therefore group size deviated from n = 12. 5 d LBW-Gln, and 5 d NBW-Gln n = 11; 5 d LBW-Ala n = 9.

¹ANOVA F test. BiW affected Asp, and Ser (P < 0.05), Suppl x Age affected Arg, and Asp (P < 0.05), Suppl x BiW affected Glu, (P < 0.05); neither the other fixed factor (Suppl) nor the interactions of the fixed factors (BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant (P > 0.05). Abbreviations: AA, Amino acids; BCAA, Branched-chain amino acids; DAA, Dispensable amino acids; DM, Dry matter; IAA, Indispensable amino acids.

S9 Table. Jejunal digesta amino metabolites concentrations from suckling low and normal birth weight male piglets

Item	Age (d)	Ala		Gln		SE	P values ¹
		LBW	NBW	LBW	NBW		
Amino metabolites, $\mu\text{mol/g}$ (DM jejunal digesta)							
Aad	5	0.192	0.196 ^b	0.210 ^d	0.487 ^{ace}	0.065	0.004
	12	0.114	0.114	0.110	0.108 ^f	0.058	
Abu	5	0.122	0.157	0.094	0.103	0.035	0.024
	12	0.074	0.040	0.051	0.040	0.031	
β -Alanine	5	0.057	0.101	0.105	0.185	0.040	0.027
	12	0.055	0.043	0.033	0.027	0.040	
Cit	5	3.35	1.85	2.00	4.71	1.27	0.676
	12	3.30	2.60	1.97	2.44	1.13	
GABA	5	0.072	0.152	0.352	0.387	0.208	0.202
	12	0.364	0.280	0.567	0.658	0.189	
Orn	5	2.12	1.27	0.840	1.93	1.31	0.005
	12	3.38	3.72	2.44	6.12	1.13	

Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; n = 12/group (5, 12 d). As the jejunum was not filled with digesta no further analysis were performed and therefore group size deviated from n = 12. 5 d LBW-Gln, and 5 d NBW-Gln n = 11; 5 d LBW-Ala n = 9.

^{a,b}Labeled LSM in a row within one BiW group and one age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{c,d}Labeled LSM in a row within one supplementation group and one age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{e,f}Labeled LSM in a column within one combined treatment-BiW group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

¹ANOVA F test. Suppl affected GABA ($P < 0.05$); neither the other fixed factor (BiW) or the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

Abbreviations: Aad, α -Amino adipate; Abu, α -Aminobutyric acid; Cit, Citrulline; DM, Dry matter; GABA, γ -Aminobutyric acid; Orn; Ornithine.

S10 Table. Jejunal protein bound amino acid concentrations from suckling low and normal birth weight male piglets

Item	Age (d)	Ala		Gln		SE	<i>P</i> values ¹
		LBW	NBW	LBW	NBW		Age
IAA, $\mu\text{mol/g}$ (DM jejunal digesta)							
Arg	5	434	428	396	525	82.6	0.176
	12	528	622	470	524	74.0	
His	5	320	268	274	325	62.5	0.793
	12	297	319	247	372	55.3	
Ile	5	770	663	665	825	92.2	0.463
	12	707	755	581	669	82.5	
Leu	5	1176	1038	1055	1327	169	0.922
	12	1134	1339	1029	1140	149	
Lys	5	934	809 ^f	836	1067	164	<0.001
	12	1439	1512 ^e	1250	1410	142	
Met	5	238	179	193	245	34.2	0.083
	12	169	179	136	175	30.8	
Phe	5	478	424	438	568	74.8	0.783
	12	488	566	427	487	65.9	
Thr	5	774	700	673	858	113	0.759
	12	790	880	651	796	102	
Trp	5	131	128	125	155	22.7	0.567
	12	144	181	123	135	20.7	
Val	5	1014	905	895	1138	139	0.759
	12	959	1101	833	930	124	
BCAA	5	2959	2606	2615	3290	397	0.807
	12	2800	3196	2443	2738	353	
Total IAA	5	6288	5544	5566	7047	895	0.444
	12	6662	7464	5731	6623	792	

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets

DAA, $\mu\text{mol/g}$ (DM jejunal digesta)								
Ala	5	898	858		797	1047	145	0.257
	12	1036	1189		899	966	128	
Asn	5	567	493		486	592	68.0	0.813
	12	582	599		502	502	59.9	
Asp	5	512	498		491	740	121	0.07
	12	726	871		624	718	108	
Cys	5	177	194		142	185	48.9	0.058
	12	235	328		224	239	44.6	
Gln	5	1148	863		911	996	106	0.002
	12	831	750		717	771	91.4	
Glu	5	1430	1145		1184	1545	200	0.973
	12	1424	1461		1091	1350	180	
Gly	5	756	788		686	979	157	0.195
	12	1011	1134		831	944	143	
Pro	5	1645	1104		1262	1393	174	0.018
	12	1011	1038		881	1018	158	
Ser	5	1191	1045		995	1167	139	0.934
	12	1162	1206		1000	1067	125	
Tyr	5	474	404		425	504	57.7	0.388
	12	414	465		370	410	51.0	
Total DAA	5	8805	7400		7386	9155	1055	0.967
	12	8441	9049		7137	7984	943	
Total AA	5	15081	12937		12943	16189	1928	0.744
	12	15103	16513		12855	14591	1716	

Values are LSM \pm SE, the largest SE is shown; $n = 12/\text{group}$ (5, 12 d). As the jejunum was not filled with digesta no further analysis were performed and therefore group size deviated from $n = 12$. 5 d LBW-Gln, and 5 d NBW-Gln $n = 11$; 5 d LBW-Ala $n = 9$.

^{e,f}Labeled LSM in a column between one treatment-birth weight group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

¹ANOVA F test. Age x Suppl affected Pro ($P < 0.05$), none of the other fixed factors (Suppl or BiW) or the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

Abbreviations: AA, Amino acids; BCAA, Branched-chain amino acids; DAA, Dispensable amino acids; DM, Dry matter; IAA, Indispensable amino acids.

S11 Table. Jejunal mRNA abundance from suckling low and normal birth weight male piglets

Function	Age (d)	Ala		Gln		SE	P values ¹
		LBW	NBW	LBW	NBW		
AA transporters							
SLC1A4	5	0.08	0.09	0.15	0.12	0.09	0.055
	12	0.07	-0.12	-0.05	-0.05	0.10	
SLC1A5	5	0.06	0.04	0.21	0.13	0.07	0.028
	12	0.07	-0.02	-0.09	0.01	0.08	
AA metabolism							
AST-2	5	0.22	0.06	0.13	0.01	0.07	0.039
	12	-0.0004	-0.11	0.03	0.002	0.07	
Antioxidative defense							
PSMC3	5	0.30	0.04	0.10	-0.005	0.08	0.094
	12	-0.04	0.004	-0.03	-0.02	0.08	
SDHA	5	0.26 ^e	0.15	0.22	0.12	0.06	<0.001
	12	-0.07 ^f	-0.05	0.05	-0.01	0.06	
CGL	5	0.11	0.11	0.09	0.07	0.07	0.056
	12	0.003	0.06	-0.12	-0.05	0.07	
GCL	5	0.09	0.11	0.12	0.06	0.06	0.026
	12	-0.07	-0.01	0.04	0.01	0.06	
GSS	5	0.12	0.08	0.13	0.06	0.06	0.017
	12	0.01	-0.10	0.03	0.002	0.06	

Values are LSM ± SE in arbitrary units and normalized to the most stable reference. The largest SE is shown; *n* = 12/group (5, 12 d). As for single samples mRNA abundance of selected targets was below the rate of quantification group size deviated from *n* = 12.

GPX-1 and GPX-2: 5 d LBW-Gln *n* = 11, and 5 d LBW-Ala *n* = 10

GSS: 12 d NBW-Gln *n* = 11

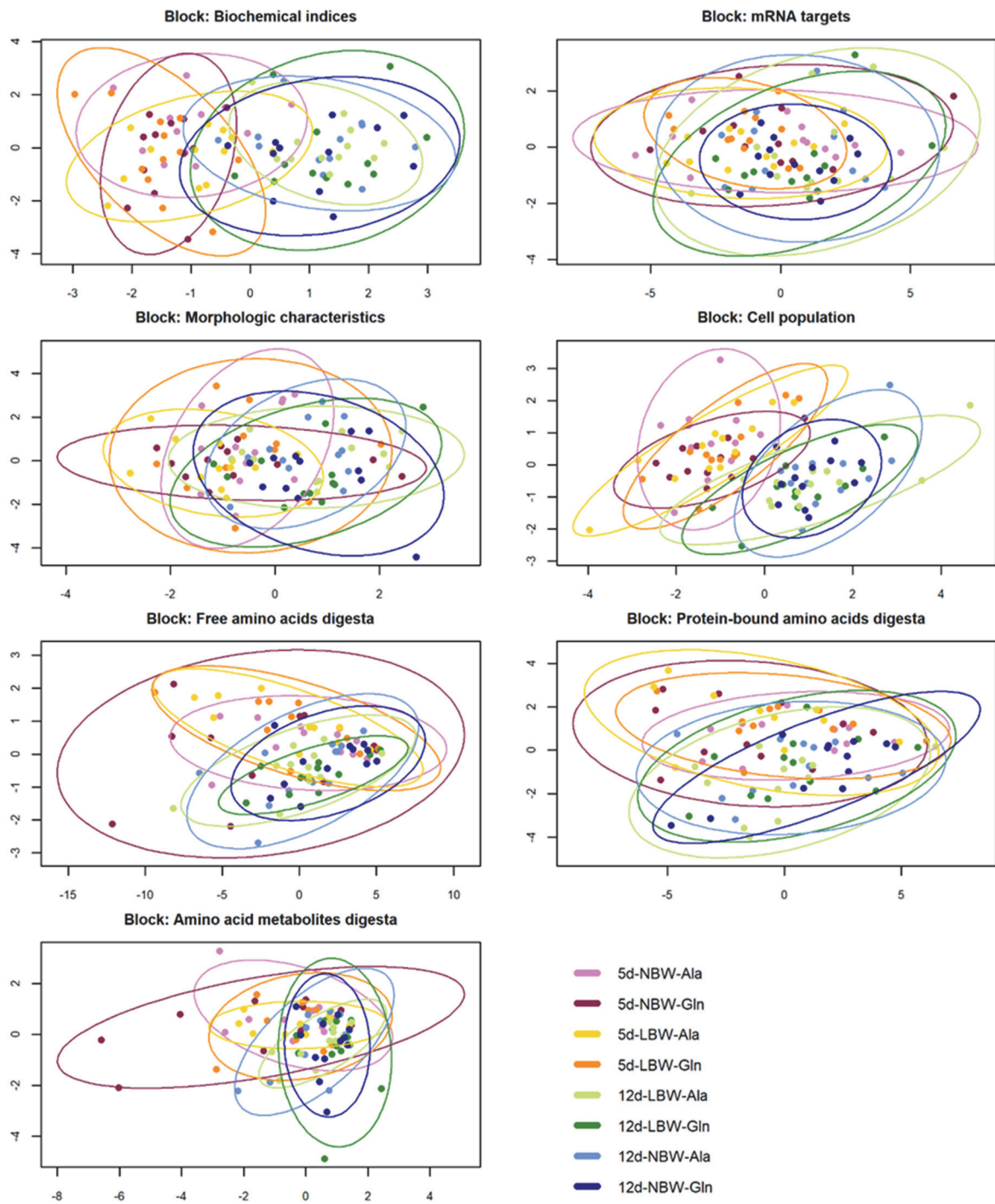
SLC1A4, SLC1A5, AST-1, SLC1A4V1: d 12 NBW Ala, d 12 NBW Gln, d 12 LBW Gln *n* = 11

^{e,f} Labeled LSM in a column between one Suppl - birth weight group without a common letter differ, *P* < 0.05 (Tukey-Kramer test).

¹ ANOVA F test. BiW affected AST-2 ($P = 0.020$), BiW x Age interaction affected PSMC3 ($P = 0.039$); neither the other fixed factor (Suppl) or the interactions of the fixed factors (Suppl x BiW; Suppl x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$). There was no significant effect of the fixed factors (Suppl, BiW or Age) or their interactions (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) ($P > 0.05$) on the mRNA abundances of genes related to amino acid transport: SLC6A19, SLC7A8, SLC1A4V1; Amino acid metabolism: AST-1, GLS, GLUD², NAGS; and antioxidative defense: CuSOD, GGT, GPX-1, GPX-2, GPX-4, GSR, GSTA, HSPCB.

² GLUD and GPX-4 were only quantified in the 5 d group because transcript abundance was too low in the 12 d group

S1 Figure. Sample plots of block PLS-DA



Sample plots of the block PLS-DA of all 143 jejunal variables assigned to ten variable groups ('blocks') and measured in 96 samples. Shown are the sample plots for the seven blocks with the best discriminatory ability: Biochemical indices, mRNA targets, Morphologic characteristics, Cell population, Free amino acids digesta, Protein-bound amino acids digesta, Amino acid metabolites digesta. The colours indicate the eight experimental groups of the 3-factorial crossed design (birth weight: LBW/NBW, supplementation: Ala/Gln and age group: 5 d/12 d) and highlight the main comparison of the two age groups (reddish: 5 d; bluegreen: 12 d).

3.11. Anteilerläuterung von Publikation mit geteilter Erstautorenschaft

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Buchallik-Schregel, Johannes	1. Erstautor	Anteil an Erstellung und Verfassung des Artikels fünfzig Prozent (50%) Sammlung und Auswertung der Daten; Durchführungen von Untersuchungen (Abschnitt: Free and protein bound AA and AA metabolites concentration in jejunal tissue and digesta, Jejunal biochemical indices and fractional protein synthesis rate; Jejunal transcript abundances related to AA metabolism and antioxidative defense); statistische Analysen
Schulze Holthausen, Johannes	2. Erstautor	Anteil an Erstellung und Verfassung des Artikels fünfzig Prozent (50%) Sammlung und Auswertung der Daten; Durchführungen von Untersuchungen (Abschnitt: Jejunal morphometry; histochemistry and immunohistochemistry) Erstellung des Manuskriptes
Sciascia, Quentin L.	Co-Autor	Sammlung und Auswertung von Daten, Durchführung von Untersuchungen; Statistische Analysen; Überarbeitung des Manuskriptes
Li, Zeyang	Co-Autor	Sammlung von Daten
Görs, Solvig	Co-Autor	Durchführung von Analysen
Eggert, Anja	Co-Autor	Statistische Analysen; Visualisierung von Daten
Tuchscherer, Armin	Co-Autor	Statistische Analysen
Zentek, Jürgen	Co-Autor	Konzeption der Studie; Betreuung, Akquise von Finanzmitteln, Überarbeitung des Manuskriptes
Metges, Cornelia C.	Korrespondierender Autor	Konzeptionierung; Betreuung, Akquise von Finanzmitteln, Überarbeitung des Manuskriptes


4. Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

PLOS ONE

 OPEN ACCESS  PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Johannes Schregel, Johannes Schulze Holthausen, Quentin L. Sciascia, Solvig Görs, Zeyang Li, Armin Tuchscherer, Elke Albrecht, Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges 

Published: January 2, 2024 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296427>

Johannes Schregel¹, Johannes Schulze Holthausen², Quentin L. Sciascia¹, Solvig Görs¹, Zeyang Li¹, Armin Tuchscherer³, Elke Albrecht⁴, Jürgen Zentek², Cornelia C. Metges^{1*}

¹ Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute of Nutritional Physiology, Dummerstorf, Germany

² Freie Universität Berlin, Department of Veterinary Medicine, Institute of Animal Nutrition, Berlin, Germany

³ Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute for Genetic and Biometry, Dummerstorf, Germany

⁴ Institute of Muscle Biology and Growth, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

Manuscript Received: 15.08.2023

Accepted: 11.12.2023

Published: 02.01.2024

*Corresponding author: metges@fbn-dummerstorf.de

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Dieses Kapitel wurde veröffentlicht in:

PLoS ONE 19(1): e0296427

DOI: [10.1371/journal.pone.0296427](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296427)

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abbreviations: AA, Amino acid; AC, Abdominal circumference; Age, age group; Ala, Alanine; BiW, Birthweight; BMI, Body mass index; BrdU, Bromodeoxyuridine; CD, Crypt depth; CD3, Cluster of differentiation 3; CLDN4, Claudin-4; CRL, Crown-rump length; D₂O, Deuterium oxide; Gln, Glutamine; IgA, Immunoglobulin A; LBW, Low birthweight; LSM, Least square mean; NBW, Normal birthweight; OCLN, Occludin; Orn, Ornithine; PBS, Phosphate-buffered saline; PBST, 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline; SEM, Standard error of the mean; SI, Small intestine; Suppl, Supplementation; TJP, Tight junction protein; TJP1, Tight junction protein 1; TJP2, Tight junction protein 2; VH, Villus height

4.1. Abstract

Breeding for higher fertility has resulted in a higher number of low birthweight (LBW) piglets. It has been shown that LBW piglets grow slower than normal birthweight (NBW) littermates. Differences in growth performance have been associated with impaired small intestinal development. In suckling and weaning piglets, glutamine (Gln) supplementation has been associated with improved growth and intestinal development. This study was designed to examine the effects of oral Gln supplementation on growth and small intestinal parameters in LBW and NBW suckling piglets. At birth (day 0), a total of 72 LBW (1.10 ± 0.06 kg) and 72 NBW (1.51 ± 0.06) male piglets were selected. At day 1, litters were standardized to 12 piglets, and experimental piglets supplemented daily with either Gln (1 g/kg BW) or isonitrogenous amounts of Alanine (Ala) as control (1.22 g/kg BW) until day 12. Creep feed was offered from day 14 onward. Subgroups of piglets were euthanized at days 5, 12, and 26 for the analyses of jejunal morphometry, cellular proliferation, glutathione concentration and transcript abundance of tight junction proteins. From age day 11 to 21, Gln supplemented LBW (LBW-Gln) piglets were heavier than Ala supplemented LBW (LBW-Ala) littermates ($P = 0.034$), while NBW piglets were heavier until age day 26 compared to LBW littermates. Villus height was higher in LBW-Gln compared to LBW-Ala on age day 12 ($P = 0.031$). Sporadic differences among supplementation and birthweight groups were detected for jejunal cellular proliferation, cellular population and glutathione concentration, whereas age was the most dominant factor. These results show that Gln supplementation improved the growth of LBW piglets compared to LBW-Ala beyond the termination of Gln supplementation, but this was not associated with consistent effects on selected parameters of jejunal development.

4.2. Introduction

In recent years, sow prolificacy has increased significantly and therefore litter inhomogeneity and the number of low birthweight (LBW) piglets [1]. Low birthweight piglets, in particular males, have impaired organ development, increased prevalence of disease and higher mortality [2]. These factors have led to animal welfare issues, and economic losses [3], as well as ethical discussions regarding modern pig production. At birth, LBW piglets have an immature small intestine (SI) [4] which has also been observed in underweight infants [5]. The development of the SI is of particular interest as it has not only digestive and immunological functions, but also creates a barrier against the environment [6]. This barrier is formed by mucus, and the epithelial cell layer of the SI, which are linked by tight junction proteins (TJP) [7]. To ensure the integrity of the SI, the epithelial cells of the villus undergo a highly dynamic

proliferation, lineage-specific differentiation and apoptosis [8,9]. For this renewal of the epithelia cells, differentiated epithelial cells exit the crypt and migrate to the tip of the villi, where they eventually become apoptotic and are shed into the intestinal lumen [10,11]. Next to enterocytes, the entero-endocrine cells and the Paneth cells, goblet cells, form the majority of the mucus lining the gastrointestinal tract. [12–14]. There are three types of gel-forming mucins (neutral, acidic and mixed) secreted by goblet cells, characterized based on their affinity for various dyes used for histological staining [14]. It is believed that neutral mucins are secreted by immature goblet cells, whilst acidic mucins are secreted by mature goblet cells [14,15]. Several factors such as age, local microbial population and availability of amino acids influence the abundance and the activity of goblet cells but the complex interaction of these factors is not completely understood [15–18]. In the colon of fattening pigs pathogenic *Brachyspira hyodysenteriae* interact with goblet cells and create an optimal environment for other pathogenic bacteria [19]. However, in humans inflammatory diseases such as ulcerative colitis are associated with depletion of goblet cells [18,20].

It has been reported that neonatal LBW piglets have impaired intestinal barrier function, which is accompanied by a lower abundance of TJP, and may explain their higher disease susceptibility [8]. Several nutritional strategies have been developed to overcome impaired growth and gut development, including amino acids (AA) supplementation [1]. The AA glutamine (Gln) is of particular interest because it is rapidly metabolized by enterocytes of the SI, and one of the most abundant AAs in sow's milk [21]. In vitro studies using IPEC-cells showed positive effects of Gln on cellular proliferation, and barrier function [7]. Furthermore, Gln can be a precursor of glutathione which is a key component for the antioxidative defense [22]. Glutamine supplementation has been investigated in piglets, but most studies used weaned piglets. Suckling piglets are nutritionally and metabolically distinct compared to weaner piglets. Under commercial conditions piglets are weaned at an age of 3–4 weeks, while the development of SI is not yet complete [23]. The intestine of neonatal piglets is adapted to digest milkbased diets very efficiently but not grain-based diets because they have not achieved their full digestive capacity compared to adult pigs due to the lack of activities of disaccharidases such as sucrase, isomaltase or maltase in the SI mucosa which increase later [23,24]. Due to early and abrupt weaning practices piglets show low feed intake, growth arrest due to villus atrophy and loss of absorptive capacity and activity, and higher susceptibility to enteral infection [25–28]. Weaning is also associated to stress as piglets are separated from their mothers, transported to other farms and mixed with piglets from other litters which has been linked with higher intestinal barrier permeability [26–28]. The observation that Gln is beneficial in weaned piglets may indicate that Gln supplementation is particularly effective under challenging conditions [29,30]. We and others have previously shown that Gln supplementation at 1 g/kg BW per day increased the growth rate of suckling piglets [21,22,31].

However, it is not clear whether a higher rate of growth is associated with persistent changes in intestinal development. From a nutritional perspective, the later suckling period is interesting because under current farming conditions the piglets are offered solid creep feed, which initiates adaptation to grain-based diets [26]. This adaptation process is associated with changes in intestinal morphology, cellular population, and enzyme activity [1]. We have previously shown that Gln supplementation from age 1 to 12 days has acute beneficial effects on the growth of LBW piglets while jejunal parameters showed little differences [31,32]. We hypothesize that Gln might have positive persistent effects on growth and jejunal development, potentially alleviating the subsequent negative effects of current weaning practices. Therefore, in the present study we investigated whether the growth advantage for LBW piglets observed until age day 12 persisted beyond the period of acute Gln supplementation. Furthermore, we studied whether Gln supplementation affects the development of jejunal morphology, cellular proliferation, oxidative capacity and TJP transcript abundance before and after introducing piglets to creep feed consumption starting on age day 14.

4.3. Material and methods

In the current study the focus is on the comparison of piglets at age 12 and 26 days, to investigate whether the effects of Gln persist after cessation (day 12) of Gln supplementation. Therefore, previously published data on zootechnical measures, jejunal AA concentrations, jejunal cellular population and jejunal morphology of age day 5 and 12 piglets [31,32] were combined with the data from the day 26 group and re-analyzed. New data on tight junction protein mRNA abundances, and cell proliferation are presented for age groups 5, 12, and 26 days.

4.3.1. Animals, experimental design, and sample collection

All experimental procedures were approved by the licensing authority State Office for Agriculture, Food Safety and Fishery, Mecklenburg-Western Pomerania, Germany (permission No. 7221.3-1-026/16), and performed according to the German Animal Welfare Act following the Directive 2010/63/EU (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes). The experiment was performed at the experimental pig facility of the Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany, and has been described in detail [31]. Briefly, piglets were selected from gilt litters and standardized to 12 piglets within 24 h after birth, containing at least one littermate pair with one LBW (0.8–1.2 kg) and one normal birthweight (BiW) (NBW; 1.4–1.8 kg)

male piglet. The selected LBW piglet population had a BiW below the lowest BiW quartile of the FBN experimental pig herd [33] and a significantly lower probability of survival compared to piglets with a birthweight > 1.18 kg [34]. The day after birth (day 1), LBW and NBW littermates were allocated to Gln (1 g/kg BW per day), or alanine (Ala) (1.22 g/kg BW per day; isonitrogenous control to Gln) supplementation groups (Suppl). Alanine supplementation was used in the control groups to compensate for the additional nitrogen supplied to the piglets via glutamine. Piglets were supplemented three times daily (07:00, 12:00, 17:00 h) until age day 12 (morning). Thus, the four treatment groups (n = 12/group) LBW-Gln, LBW-Ala, NBW-Gln and NBW-Ala were each studied in three different age groups (Age) each, i.e. day 5 (n = 48), 12 (n = 48), and 26 (n = 48), with 5 and 12 day groups examining the effects during supplementation, and the day 26 group, to study potential persistent effects beyond the supplementation period. However, the majority of the measurements in the day-5 age group has been reported previously [31,32].

Creep feed (S1 Table) was provided to the entire litter (experimental and non-experimental piglets) from age day 14 onwards (day 26 group). Zootechnical measurements including rectal temperature, crown-rump length (CRL), and abdominal circumference (AC) were recorded at birth and on age day 12, 14, 21, and 26, and the body mass index (BMI) was calculated as described [31]. Piglets were euthanized by exsanguination on age day 5, 12 or 26. Before euthanasia piglets were stunned with a bolt gun (age day 5) or electrically stunned (age day 12 and 26) according to legally prescribed procedures. Two hours (h) prior to euthanasia piglets were supplied with glutamine (0.33 g/kg BW) or alanine (0.41 g/kg BW), respectively, and one h before, piglets were injected i.p. with bromodeoxyuridine (BrdU) (12 mg/kg BW; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Jejunal tissue was sampled as reported [32].

4.3.2. Measurement of milk intake

Milk intake over 24 h was measured from age day 25 to 26 using the deuterium oxide (D₂O) isotope dilution method [31]. Piglets were injected i.p. with D₂O (0.2 mL/kg BW, 70 atom % D diluted to 20% in sterile physiological saline solution; B. Braun SE, Melsungen, Germany) 24 h before euthanasia. Afterwards piglets were isolated for one h to prevent suckling and to guarantee that the body water pool and D₂O had equilibrated. One h (day 25) and 24 h (day 26, at euthanasia) after D₂O injection blood samples were taken and its D enrichment was determined to calculate milk intake [31].

4.3.3. Jejunal morphometry and immunohistochemistry

Assessment of morphometry and quantification of goblet cells. Histo-fixed jejunum samples were cut into 5 μm sections using a microtome (Type 1400 Fa. Leitz Wetzlar, Germany). Jejunal mucosa morphometry, number and mucin type of goblet cells were determined using paraformaldehyde fixed tissue, and Alcian blue pH 2.5 periodic acid Schiff staining, as previously described [32]. A microscope (Photomicroscope BX43F, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus DP72, Tokyo, Japan) was used and images were analyzed with the cellSens imaging software (v. 1.4, Olympus). Five crypts and corresponding villi were randomly selected from at least four sections per animal. The distance from the crypt mouth to the tip of the villus was defined as villus height (VH). Whereas the distance from base of the crypt to the crypt mouth was specified as crypt depth (CD).

Quantification of lymphocytes, IgA positive cells, and bromodeoxyuridine incorporation. The quantification of immunoglobulin A (IgA) and cluster of differentiation 3 (CD3)-positive intraepithelial lymphocytes was performed as reported [32] using paraformaldehyde fixed tissue and immunohistochemistry. For IgA quantification slides were incubated at 4° C overnight with the following primary antibody: goat anti-porcine IgA 1:4000 (NB724, Novus Biologicals, Abingdon, UK). Immune reaction was visualized using a 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution (DAB Substrate kit, Vector Laboratories). IgA-positive lymphocytes were quantified in jejunal lamina propria according to Waly et al. (2001) [35].

For quantification of CD-3 positive lymphocytes slides were incubated with a primary antibody (mouse anti porcine CD3 epsilon, CAT NO 4510–01, Southern Biotech) overnight at 4°C. The primary antibody was visualized using an indirect two-step method (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit, ab236466, ABCAM). A horseradish peroxidase (HRP)-conjugated micropolymer (goat anti-rabbit HRP conjugate, 58009, ABCAM) was used as secondary antibody. All immunohistochemistry was performed according to published procedures [36]. For evaluation of the stained sample, a double-blind quantification of CD3-positive intraepithelial lymphocytes was carried out. Only intact and complete villi (two sections per animal, five villi per section) were evaluated. The number of positive lymphocytes was expressed per 100 enterocytes. Bromodeoxyuridine is an analogue of the nucleoside thymidine and BrdU incorporation is a measure of cellular proliferation. Bromodeoxyuridine incorporation was determined by Alexa Fluor 488 BrdU labelling [37], with the following modifications. Frozen jejunal tissue (-80°C) was cryosectioned into 5 to 6 slices per animal (5–8 μm , Leica CM3050 Cryostat Microtome; Leica, Nussloch, Germany), with the following BrdU-labelling pre-treatment steps: 1) Fixation (4% paraformaldehyde, 20 min, Roti-Histofix, Roth, Karlsruhe, Germany); 2) Permeabilization (0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBST), 10 min); 3) DNA denaturation (2 M HCl, 37°C, 60 min); blocking of unspecific bindings

of the secondary antibody (10% goat serum, 15 min, 16120–099, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). The primary antibody was a monoclonal mouse anti-BrdU (1170376, Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Switzerland; 1:100 dilution in PBST containing 2% goat serum) whilst the secondary antibody was an Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A11059, Thermo Fisher Scientific; 1:500 dilution in PBST). To visualize unlabeled nuclei, sections were counterstained 5 min with propidium iodide (5 µg/mL, no. P4170, Sigma-Aldrich). Sections were placed under the cover of ProLong Antifade mounting medium (Thermo Fisher Scientific) and coverslips. A Nikon Microphot SA fluorescence microscope (Nikon, Dußseldorf, Germany) equipped with a CC-12 color camera (OSIS, Muñster, Germany) was used to detect immunofluorescence of BrdU and propidium iodide-stained nuclei. Images were analyzed with Cell[^]F image analysis software (OSIS). The total area of BrdU-labelled crypt and villi cell nuclei (labelled green) as well as the total area of all nuclei (labelled red) were determined in 4 randomly chosen fields per slice and 20 fields (10 crypt and 10 villi) per animal. The area of all detected objects was measured in red and green channels, respectively. The ratio between the BrdU-labelled area and total nuclei area was determined as a measure of cell proliferation.

4.3.4. Localization of tight junction proteins in jejunal tissue

Immunohistochemistry was used to visualize the location of the following target proteins: Tight junction protein 1 (TJP1) and tight junction protein 2 (TJP2), claudin-4 (CLDN4) and occludin (OCLN). Jejunal tissue frozen in OCT matrix (OCT Embedding Matrix, Roth, Karlsruhe, Germany), was cryo-sectioned to obtain 5 to 6 slices per animal (10 µm, Leica CM3050 Cryostat Microtome; Leica, Nußloch, Germany). For TJP1 and TJP2 detection, slides were stored for 15 min in 4% paraformaldehyde, (Roti-Histofix, Roth) for fixation, whilst the slides for CLDN4 and OCLN detection were fixed for 10 min in methanol at -20°C. Slides were then rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min. Unspecific binding of the secondary antibodies was blocked by incubating slides with goat serum for 15 min (10% goat serum in PBS, 16120–099, Thermo Fisher Scientific). The following primary antibodies were used for overnight incubation at 4°C in a humidity chamber: TJP1 (rat, SC-33725, Santa Cruz, California, USA, 1:50 dilution in PBST containing 2% goat serum), TJP2 (rabbit, CS-2847, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, 1:50 dilution in PBS containing 2% goat serum), CLDN4 (mouse, 3E2C1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 1:200 dilution in PBST containing 0.5% goat serum), and OCLN (mouse, SC-133256, Santa Cruz, 1:200 dilution in PBS containing 0.5% goat serum). Slides were then rinsed three times in PBS for 10 min, followed by incubation with the respective secondary antibody in a dark humidity chamber (for TJP1 Alexa Fluor 488, goat anti rat IgG, 1:1000 dilution in PBST; for TJP2 Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG, 1:1000 dilution in PBS; for OCLN and CLDN4 Alexa

Flour 594 goat anti mouse IgG, 1:1000 dilution in PBS). After the slides were washed three times for 10 min in PBS, they were incubated with 1 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for 5 min. Afterwards, the slides were rinsed twice with PBS for 5 min and once with ultra-pure water. Then, slides were mounted with coverslips using ProLong Antifade mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Jejunal tight junction proteins (TJP1, TJP2, OCLN, CLDN4) were visualized in cross sections using Nikon Microphot SA fluorescence microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany) equipped with a CC-12 color camera and CellF image analysis software (OSIS, Münster, Germany).

4.3.5. Quantification of jejunal transcript abundances connected to barrier function, apoptosis and cellular proliferation

Purification of RNA and cDNA synthesis. Isolation and purification of RNA, and cDNA synthesis were performed as described [32]. Briefly, RNA was extracted from frozen jejunal tissue (80–120 mg) using the trizol method, according to the manufacturer's instructions (peq- Gold TriFast; VWR International, Hanover, Germany). A microcolumn-based system (Qiagen, Hilden, Germany) was then used to purify the isolated RNA. The RNA integrity number ranged from 6.9 to 9.9 (mean 8.9 ± 0.7) and was measured using a Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The SensiFast cDNA Synthesis Kit (Bioline, Berlin, UK) was utilized to reverse transcribe purified RNA (500ng) to cDNA following the manufacturer's instructions.

Primer design, real time PCR assay and data evaluation. Primers were designed, manufactured, and verified [32]. Primer details are presented in the supporting information (S2 Table). The real time PCR assays were operated on the LC 96 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Setup and reaction conditions were as published [32]. The LinRegPCR v 2014.5 software was used to calculate PCR efficiency and quantification cycle values [38]. Quantification cycle values and average PCR-efficiency are reported in the supporting information (S2 Table). The GeNorm applet from qBASEplus was applied to select the reference genes from 6 candidates (S2 Table) with the most stable expression across BiW and Suppl. In the 5-day group, beta actin (ACTB), ribosomal protein S18 (RPS18), and DNA topoisomerase 2-beta (TOP2B) were chosen, while in the 12-day group peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and ribosomal protein S18 (RPS18) were selected. In the 26-day group peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) were most stably expressed. Target gene mRNA abundances were normalized using the qBASEplus software (CellCarta, Antwerpen, Belgium) and the selected reference genes. The qBASEplus software was used to convert quantification cycle values into Log-CNRQ (Calibrated Normalized Relative Quantity) values, considering amplification efficiencies,

normalization factors, and interrun variations. The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines were followed to report all data [39].

4.3.6. Concentration of amino acids and glutathione in jejunal tissue

Amino acid concentration in plasma, and jejunal tissue. At euthanasia blood samples were collected in K-EDTA (Sarstedt, Germany) tubes and centrifuged at 1,576 g for 20 min (4°C) to generate plasma and stored at -80°C. Plasma samples were prepared for HPLC analysis and free AAs concentration was measured as previously published [31], using HPLC and a 250 × 4 mm Hyperclone ODS (C18) 120Å column, (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Enzymatic hydrolysis was performed to determine the concentration of Gln and other protein-bound AA to calculate total AAs in jejunal tissue as described [32]. The concentrations of free and protein-bound AAs were measured using a HPLC equipped with 5 µm C18 columns, 250 x 4 mm HyperClone™ 120 Å or 250 x 4.6 mm Gemini 1 110 Å (both Phenomenex). To calculate the concentration of protein bound AAs, the concentration of free AA were subtracted from the concentration of total AAs [32]. Additionally, a BCA reagent (Biorad Laboratories, Feldkirchen, Germany) was used to measure total protein concentration in jejunal tissue photometrically.

Glutathione in jejunal tissue. The quantification of glutathione in jejunal tissue was performed as described [40]. Frozen jejunal tissue (30 mg) was mixed with 60 µL of iodoacetic acid (Sigma Aldrich, Munich, Germany) (25 mg/mL in 0.5 M bicine buffer pH 9.0). Subsequently, the samples were diluted with 600 µL ultrapure water. A HPLC equipped with 5 µm C18 columns, 250 x 4 mm HyperClone™ 120 Å or 250 x 4.6 mm Gemini1 110 Å (both Phenomenex) was used to measure the concentration of glutathione in jejunal tissue.

4.3.7. Statistical evaluation and data presentation

Previously published zootechnical data, plasma and jejunal tissue free and protein-bound AA concentrations, jejunal morphometry and cellular populations of the 5- and 12-day group piglets [31,32] were combined with data from the 26-day group and reevaluated as a single joint dataset.

The necessary sample size was computed with CADEMO for Windows ANOV version 4.03 (2000; BioMathGmbH, Rostock, Germany), based on a two or three level factor combination of (1) supplementation (Ala, Gln), (2) birthweight (LBW, NBW), and (3) age group (5, 12, 26 days). Alpha and beta levels were defined as $\alpha = 0.05$, and $\beta = 0.20$, respectively. The group

size for each experimental procedure was $n = 12$, unless otherwise indicated. Statistical analysis of the data was performed in SAS (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) via Analysis of Variance (ANOVA), with normal distribution assessed using the Shapiro-Wilks test, and the model selection based on Akaike's information criterion [41]. For all models pig was the experimental unit. Model 1, used for the evaluation of average daily body weight gain, jejunal morphology, histological parameters, AA concentration, cellular proliferation and real time PCR assessment, was a MIXED model that contained the fixed effects Age group (5, 12, 26 days), Suppl (Gln, Ala), BiW (LBW, NBW), the Age \times Suppl \times BiW interaction and gilt as a random effect to model the possible dependence of littermates from the same gilt. Model 2, used for the assessment of CRL, AC, BMI, and rectal temperature, was the same as Model 1 but also included a repeated measures statement and the fixed effect Age at measurement (days 0, 5, 7, 12, 14, 21, 26). The repeated measures statement accounted for measurements taken in the same animal at different ages using the SUBJECT = animal option to define the blocks of the block-diagonal residual covariance matrix and the TYPE = VC option to define their covariance structure. Model 3, assessing BW was the same as Model 2, but contained the fixed effect of Age at measurement (days 0–12, 14, 21, 26) and a linear spatial covariance structure (TYPE = SP (LIN)). If $P < 0.05$ (Tukey–Kramer test) differences were considered significant. Data are shown as least square means (LSM) and standard error of the mean (SEM). Two animals with their respective supplementation partners were removed from the statistical analysis due to growth arrest.

4.4. Results

4.4.1. Zootechnical measurements

Supplementation affected AC, while BiW had an influence on BW, CRL, AC, BW gain, and BMI. The factor Age affected all parameters measured while the interaction of Age × Suppl × BiW affected BW only (Table 1). In LBW-Gln compared to LBW-Ala piglets, BW was higher from age days 12 to 21 ($P = 0.034$). Furthermore, AC was higher at age day 26 in NBW-Gln compared to NBW-Ala piglets ($P = 0.042$). Throughout the study, BW gain was higher in the NBW compared to LBW littermates independent of supplementation ($P < 0.001$). Consequently, BW was higher in NBW compared to LBW at each time point ($P < 0.001$). Piglets with NBW were born with a higher AC, BMI and CRL compared to LBW piglets ($P = 0.001$). During the entire trial (birth to 26 days of age), NBW-Ala had a higher AC and CRL compared to LBW-Ala ($P = 0.048$), whilst CRL was higher in NBW-Gln than in LBW-Gln on age day 14 and 26 ($P = 0.043$), and AC was higher in NBW-Gln compared to LBW-Gln on age day 12 and 26 ($P < 0.001$). Body mass index was higher in NBW-Ala compared to LBW-Ala at age day 26 ($P = 0.040$). The parameters rectal temperature ($P = 0.179$) and milk intake ($P = 0.061$) were not different among BiW and Suppl groups (Table 1).

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Table 1. Acute (age day 12) and persistent (age days 13–26) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on zootechnical measurements in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Item	Age (day)	Ala		Gln		SEM	P-Value ¹			
		LBW	NBW	LBW	NBW		Suppl	BiW	Age	Interaction ²
BW (kg)	birth	1.10 ^d	1.53 ^c	1.09 ^d	1.50 ^c	0.061	0.184	<0.001	<0.001	<0.001
	12	3.06 ^b	3.96 ^c	3.25 ^a	4.02 ^c	0.067				
	14	3.33 ^b	4.34 ^c	3.54 ^a	4.41 ^c	0.075				
	21	4.75 ^b	6.10 ^c	5.15 ^a	6.15 ^c	0.092				
	26	5.88 ^d	7.32 ^c	5.94 ^d	7.30 ^c	0.097				
BWG (g/day)	6–12	165 ^c	200 ^d	179 ^c	204 ^d	8.36	0.303	<0.001	-	-
	13–26	186 ^c	223 ^d	187 ^c	224 ^d	10.9	0.963	<0.001	-	-
AC (cm)	birth	21.7 ^d	24.5 ^c	22.0 ^d	24.2 ^c	0.371	0.002	<0.001	<0.001	0.980
	12	32.4 ^d	34.1 ^c	32.4 ^d	35.4 ^c	0.617				
	14	32.3 ^d	35.4 ^c	33.8	35.2	0.641				
	21	37.2 ^d	39.4 ^c	39.1	40.8	0.706				
	26	41.0 ^d	42.6 ^b	41.2 ^d	44.4 ^a	0.641				
CRL (cm)	birth	22.6 ^d	24.8 ^c	22.4 ^d	24.9 ^c	0.416	0.630	<0.001	<0.001	0.521
	12	31.5 ^d	34.0 ^c	32.9	34.4	0.665				
	14	33.2 ^d	36.1 ^c	32.9 ^d	36.3 ^c	0.684				
	21	38.6 ^d	41.7 ^c	38.9	40.7	0.752				
	26	41.6 ^d	44.2 ^c	41.0 ^d	44.4 ^c	0.684				
BMI (kg/m ²)	birth	20.9 ^d	24.1 ^c	21.8 ^d	24.0 ^c	0.707	0.410	<0.001	<0.001	0.999
	12	31.7	33.9	30.9	33.3	1.12				
	14	30.0	33.1	31.2	33.1	1.27				
	21	32.5	34.6	34.1	36.8	1.27				
	26	34.2 ^d	37.6 ^c	35.2	37.2	1.15				

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Rectal temperature (C°)	birth	37.3	37.5	37.3	37.4	0.184	0.289	0.772	<0.001	0.730
	12	38.4	38.0	37.8	38.4	0.297				
	14	39.0	39.0	38.6	38.8	0.308				
	21	39.2	39.2	39.0	38.9	0.340				
	26	39.1	38.8	38.3	38.4	0.308				
Milk intake (g/kg BW day)	26	199	144	144	174	22.3	0.578	0.551	.	.

Values are LSM ± SEM; day 0–5 *N* = 36/group, day 6–12 *N* = 24/group, day 14–26 *N* = 11/group.

¹ ANOVA F-Test; none if the interactions (Suppl x BiW, Suppl x Age, or BiW x Age) were significant (*P* > 0.05).

² Interaction Suppl x BiW x Age.

^{a,b} Labeled LSM in a row within one Birthweight group and one Age group without a common letter differ, *P* < 0.05 (Tukey-Kramer test).

^{c,d} Labeled LSM in a row within one Supplementation group and one Age group without a common letter differ, *P* < 0.05 (Tukey-Kramer test).

Abbreviations: AC = Abdominal circumference, BiW = Birthweight, BMI = Body mass index, BW = Bodyweight, BWG = Bodyweight gain, CRL = Crown-rump length, Suppl = Supplementation.

4.4.2. Jejunal morphometry and goblet cell abundance

There was an effect of Suppl on VH and the number of mixed mucins containing goblet cells in the villus area (Table 2) (Fig 1), whilst Age affected all other parameters except for the abundance of goblet cells containing acidic mucins in the villus area, and the number of goblet cells containing mixed mucins in the crypt area. At age day 12, VH and the ratio of VH to CD was higher in LBW-Gln compared to LBW-Ala ($P = 0.031$), whilst the number of goblet cells containing neutral, and mixed mucins and the total number of goblet cells in the villus area at age day 26 ($P = 0.022$) was higher in LBW-Ala. At age day 26, the CD was lower in LBW-Gln compared to NBW-Gln ($P = 0.033$). In the 12-day group, VH, the ratio of VH to CD, and the number of goblet cells containing acidic mucins in the crypt area were greater than in the 26-day group ($P < 0.001$). Crypt depth was lower, the total number of goblet cells, as well as the number of goblet cells containing neutral mucins in crypt and villus area, and the number of goblet cells containing mixed mucins in the villus area were lower ($P < 0.001$) in the 12-day than in the 26-day group.

Table 2. Acute (12-day group) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on jejunal morphometry and the abundance of goblet cells in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Item	Age (day)	Ala		Gln		SEM	Age ²	SEM	P-Value ¹		
		LBW	NBW	LBW	NBW				Suppl	BiW	Age
Villus height (µm)	12	899 ^b	856	1060 ^a	933	56.1	937 ^A	33.1	0.017	0.305	<0.001
	26	384	398	441	432	54.1	414 ^B	31.0			
Crypt depth (µm)	12	149	145	150	143	9.46	147 ^B	6.28	0.455	0.684	<0.001
	26	254	250	245 ^d	267 ^c	8.94	254 ^A	5.68			
Villus height: crypt depth ratio	12	6.17 ^b	6.00	7.10 ^a	6.77	0.428	6.51 ^A	0.256	0.228	0.067	<0.001
	26	1.58	1.62	1.9	1.67	0.412	1.69 ^B	0.238			
Villi acidic mucin	12	4.83	4.92	4.68	4.36	0.532	4.70	0.319	0.712	0.865	0.279
	26	5.69	5.13	4.78	4.85	0.512	5.11	0.297			
Villi neutral mucin	12	6.71	7.41	7.12	7.15	0.946	7.10 ^B	0.513	0.150	0.756	<0.001
	26	19.9 ^a	17.9	16.9 ^b	17.1	0.928	17.9 ^A	0.502			
Villi mixed mucin	12	5.49	6.10	5.12	5.51	0.985	5.55 ^B	0.509	0.013	0.900	<0.001
	26	22.7 ^a	20.5	19.3 ^b	19.6	0.972	20.5 ^A	0.491			
Villi total mucin	12	17.0	18.4	16.8	16.9	2.09	17.3 ^B	1.08	0.056	0.851	<0.001
	26	48.2 ^a	43.5	41.0 ^b	41.6	2.08	43.6 ^A	1.06			
Crypt acidic mucin	12	18.2	18.4	19.0	21.9	1.57	19.4 ^A	0.892	0.089	0.630	<0.001
	26	12.3	12.4	13.0	11.7	1.53	12.3 ^B	0.844			
Crypt neutral mucin	12	11.7	13.8	12.4	14.2	1.83	13.0 ^B	0.857	0.870	0.856	<0.001
	26	33.0	33.2	34.3	30.9	1.74	32.8 ^A	0.805			
Crypt mixed mucin	12	18.3	19.0	17.9	19.3	1.44	18.6	1.18	0.669	0.660	0.052
	26	20.6	20.7	21.6	19.4	1.43	20.6	1.07			
Crypt total mucin	12	48.3	51.2	49.2	55.4	3.31	51.0 ^B	2.12	0.557	0.888	<0.001
	26	66.1	66.4	68.6 ^c	61.7 ^d	3.15	65.7 ^A	1.93			

Values are LSM ± SEM; 12-day group $N = 48$, $n = 12$ /subgroup, 26-day group $N = 44$, $n = 11$ /subgroup.

¹ ANOVA F-Test, none of the interactions (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

² Age; LSM values shown include all values measured within the indicated age group, regardless of BiW and supplementation.

^{a,b} Labeled LSM in a row within one Birthweight group and one Age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{c,d} Labeled LSM in a row within one Supplementation group and one Age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{A–B} Indicate significant differences among Age groups $P < 0.05$ (Tukey–Kramer test).

Abbreviations: BiW = Birthweight, Suppl = Supplementation.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

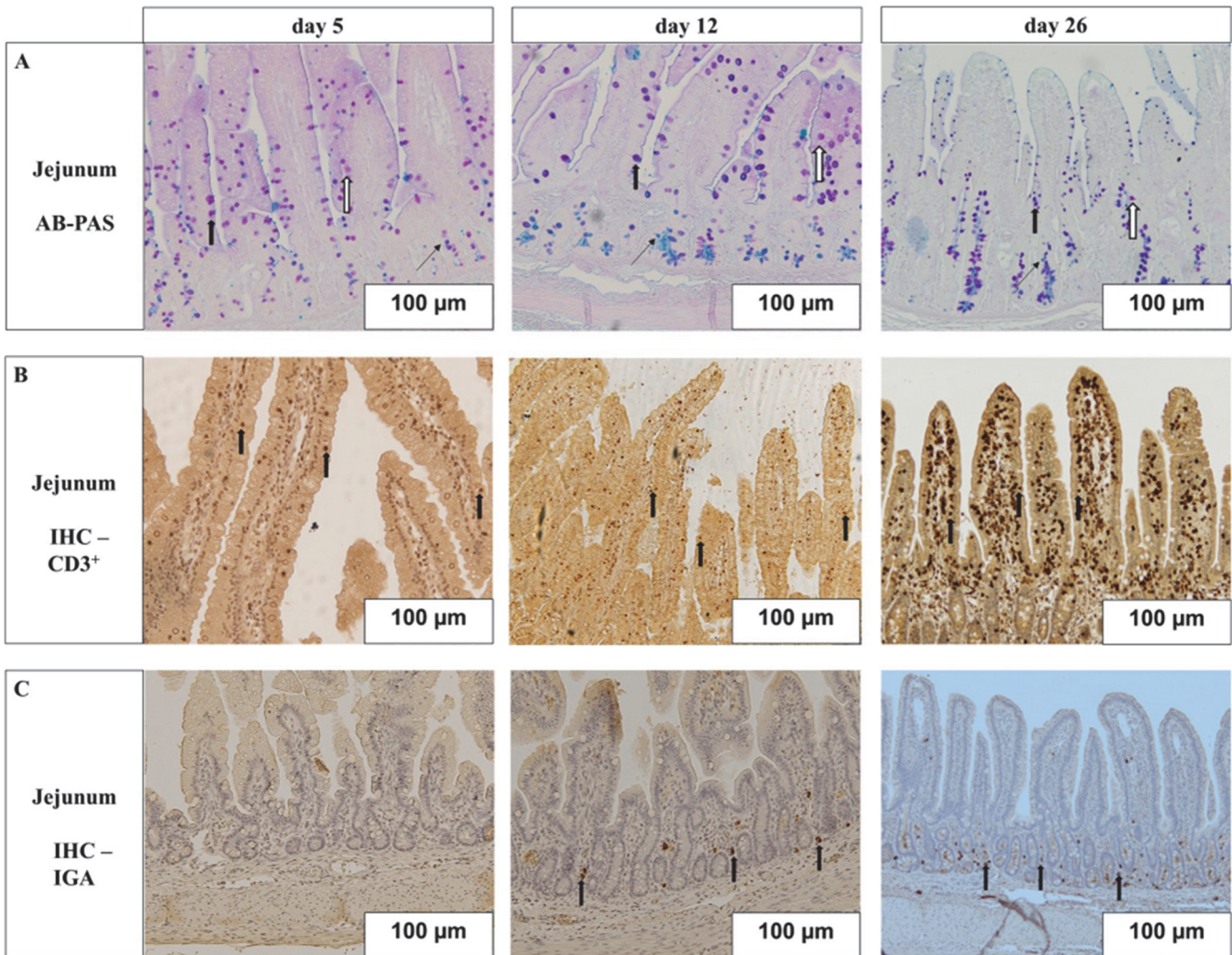


Fig 1. Jejunal histomorphology and immunohistochemistry of 5-, 12-, and 26-day-old suckling piglets.

(A) Alcian blue pH 2.5 -periodic acid Schiff stained jejunal tissue with stained goblet cells. Different arrows highlight goblet cells containing different mucins: Narrow arrow = acidic mucins (blue stained), wide closed arrow = neutral mucins (magenta stained, wide open arrow = mixed mucins (purple stained); days 5, 12, 26.

(B) Representative immunohistochemistry images of CD3, counterstained with hematoxylin, arrows showing positive stained intraepithelial CD3+ cells in villi; days 5, 12, 26.

(C) Representative immunohistochemistry images of IgA positive stained cells in lamina propria. No IgA positive cells were detected at age day 5, arrows indicating IgA positive cells; days 5, 12, 26.

Abbreviations: AB-PAS = Alcian blue pH 2.5-periodic acid Schiff, CD 3 = Cluster of differentiation 3, IgA = Immunoglobulin A.

4.4.3. Lymphocyte subsets in jejunal tissue

The factor Age influenced all investigated parameters (Table 3). At age day 26, the number of IgA positive lymphocytes in the villus and crypt area was lower in LBW-Gln compared to NBW-Gln ($P = 0.004$), while the number of intraepithelial CD3 positive lymphocytes was higher in NBW-Gln ($P = 0.031$). The number of IgA and CD3 positive lymphocytes was lower in the 12-day compared to the 26-day group ($P = 0.008$).

Table 3. Acute (12-day group) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the abundance of CD3 positive and IgA positive lymphocytes in the jejunum of low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Item		Age (day)	Ala		Gln		SEM	Age ²	SEM	P-Value ¹
			LBW	NBW	LBW	NBW				
IgA positive cells ³	Area 1	12	0.333	0.167	0.000	0.083	0.303	0.150 ^B	0.146	0.007
		26	0.750	0.583	0.167 ^d	1.42 ^c	0.303	0.730 ^A	0.146	
	Area 2	12	0.077	0.327	0.097	0.180	0.481	0.170 ^B	0.152	<0.001
		26	1.71	1.29	1.78	1.86	0.468	1.66 ^A	0.152	
	Area 3	12	9.84	10.1	8.26	8.93	0.814	9.28 ^B	0.268	<0.001
		26	18.3	16.8	16.5 ^d	18.5 ^c	0.805	17.5 ^A	0.255	
CD3 positive cells ³		12	6.61	6.31	6.34	6.75	3.31	6.50 ^B	1.53	<0.001
		26	27.1	29.0	28.0 ^d	30.7 ^c	3.15	28.7 ^A	1.34	

Values are LSM ± SEM; 12-day group $N = 48$, $n = 12$ /subgroup, 26-day group $N = 44$, $n = 11$ /subgroup.

¹ ANOVA F-Test, none of the other main effects (Suppl. or BiW), or interactions (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

² Age; LSM values shown include all abundances measured within the indicated age group, regardless of BiW and supplementation.

³ Group size deviated from $n = 12$ for the parameter CD3+ lymphocytes due to damaging of lamina propria during thawing. NBW-Gln 26-day group, $n = 10$.

^{c,d} Labeled LSM in a row within one Supplementation group and one Age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{A-B} Indicate significant differences among Age groups $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

Abbreviations: Area 1 = villus; Area 2 = end of villus/crypt mouth; Area 3 = Area beside the crypt region, BiW = Birthweight, Suppl = Supplementation.

4.4.4. Incorporation of bromodeoxyuridine in jejunal tissue

Bromodeoxyuridine-positive cells were detected in the crypt (S1 and S2 Figs) and in the villus section (S1 and S3 Figs). There was a significant effect of Age on all evaluated parameters (Table 4). Differences between BiW and Suppl groups were only observed in piglets on age day 26. In this group the ratio of BrdU-positive area to the total area of nuclei was higher in NBW-Gln compared to NBW-Ala ($P = 0.011$), while the same parameter was higher in LBW-Ala compared to NBW-Ala ($P = 0.021$). The percentage of the BrdU-positive area in the crypt section was higher in LBW-Gln compared to NBW-Gln ($P = 0.009$). Total nuclei area in both sections was larger in the 12-day compared to the 26-day group ($P < 0.001$), all other investigated parameters were lower in piglets of the 12-day group ($P < 0.001$)

Table 4. Acute (5-day and 12-day groups) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) in jejunal tissue in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Item ²	Age (day)	Ala		Gln		SEM	Age ³	SEM	P-Value ¹	
		LBW	NBW	LBW	NBW					
Villus area (%)	Total nuclei area	5	52.0	54.7	58.2	57.7	2.89	55.7 ^A	52.0	<0.001
		12	58.4	58.6	57.9	59.6	2.94	58.6 ^A	58.4	
		26	26.9	30.0	30.8	27.9	2.83	28.9 ^B	26.9	
	BrdU positive nuclei	5	0.620	0.714	0.728	0.786	0.340	0.712 ^B	0.225	
		12	0.762	0.678	0.66	0.896	0.331	0.749 ^B	0.224	
		26	3.73	3.23	4.08	4.17	0.325	3.80 ^A	0.204	
	Ratio BrdU positive area to Total nuclei area	5	0.014	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014 ^B	0.014	
		12	0.014	0.013	0.012	0.015	0.013	0.014 ^B	0.014	
		26	0.151 ^c	0.108 ^{d, b}	0.142	0.156 ^a	0.013	0.142 ^A	0.151	
Crypt area (%)	Total nuclei area	5	61.7	60.6	65.8	63.9	2.27	63.2 ^A	1.66	<0.001
		12	58.3	58.9	58.0	59.5	2.22	58.7 ^A	1.68	
		26	37.5	38.7	40.3	36.5	2.15	38.2 ^B	1.49	
	BrdU positive nuclei	5	15.7	15.0	15.2	14.7	1.27	15.1 ^B	0.901	
		12	14.4	13.6	14.5	15.1	1.26	14.4 ^B	0.909	
		26	20.4	18.9	20.5 ^c	17.1 ^d	1.18	19.2 ^A	0.809	
	Ratio BrdU positive area to Total nuclei area	5	0.257	0.236	0.231	0.228	0.029	0.24 ^B	0.019	
		12	0.248	0.238	0.250	0.252	0.028	0.25 ^B	0.019	
		26	0.562	0.500	0.522	0.466	0.028	0.51 ^A	0.017	

Values are LSM ± SEM; 5-day group $N = 45$, 12-day group $N = 48$, $n = 12$ /subgroup, 26-day group $N = 44$, $n = 11$ /subgroup.

¹ANOVA F-Test, none of the other main effects (Suppl. or BiW), or interactions (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

²Group size deviated from $n = 12$ for bromodeoxyuridine related parameters because of insufficient accumulation of bromodeoxyuridine in jejunal tissue of 5-day groups NBW-Gln, NBW-Ala, LBW-Gln $n = 11$; LBW-Ala $n = 12$.

³Age, LSM values shown include all values measured within the respective age group, regardless of BiW and supplementation.

^{a,b} Labeled LSM in a row within one Birthweight group and one Age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{c,d} Labeled LSM in a row within one Supplementation group and one Age group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

A–B Indicate significant differences among Age groups $P < 0.05$ (Tukey–Kramer test).

Abbreviations: BiW = Birthweight, BrdU = bromodeoxyuridine, Suppl = Supplementation.

4.4.5. Transcript abundance and location of tight junction proteins in jejunal tissue

There was an effect of BiW on the transcript abundance of TJP1, CLDN4, and OCLN (Table 5). At age day 26, the mRNA abundance of TJP2 was higher in NBW-Gln compared to NBW-Ala ($P = 0.019$), and the abundance of TJP2 was higher in LBW-Ala compared to NBW-Ala ($P = 0.003$). At age day 5, TJP1 and OCLN abundance was higher in LBW-Ala compared to NBW-Ala ($P = 0.011$). In all BiW and Age groups, TJP1 (S4 and S5 Figs) and TJP2 (S6 and S7 Figs) were located at the basolateral and the apical side of intestinal epithelial cells. Also, CLDN4 (S8 and S9 Figs) and OCLN (S10 and S11 Figs) were detectable in crypt as well as in the villus region and were identified at the basolateral and apical side of intestinal epithelial cells. There were no obvious differences in the location of these TJP depending on the main factors assessed.

Table 5. Acute (5-day and 12-day groups) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the mRNA abundance of tight junction proteins, and targets of cellular proliferation and apoptosis in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Item ²	Age (day)	Ala		Gln		SEM	Age ³	SEM	<i>P</i> -Value ¹
		LBW	NBW	LBW	NBW				
TJP1	5	0.231 ^c	-0.077 ^d	0.047	0.110	0.082	0.078	0.041	0.017
	12	-0.028	-0.027	0.008	-0.015	0.082	-0.015	0.041	
	26	0.044	-0.009	0.017	-0.032	0.085	0.005	0.043	
TJP2	5	0.171	0.151	0.121	-0.069	0.092	0.094	0.049	0.031
	12	-0.061	-0.047	0.040	0.012	0.092	-0.014	0.050	
	26	0.161 ^c	-0.248 ^{b, d}	0.106	0.063 ^a	0.095	0.021	0.050	
CLDN4	5	0.195	0.138	0.033	0.003	0.081	0.092	0.044	0.114
	12	-0.009	-0.091	0.014	0.031	0.082	-0.014	0.045	
	26	0.072	-0.155	0.084	0.031	0.084	0.008	0.045	
OCLN	5	0.254 ^c	-0.079 ^d	0.127	-0.060	0.098	0.061	0.053	0.012
	12	-0.046	-0.045	-0.001	0.016	0.097	-0.019	0.053	
	26	0.025	-0.174	-0.025	-0.157	0.101	-0.083	0.054	
PCNA	5	0.058	0.000	0.077	0.115	0.065	0.063	0.033	0.520
	12	-0.043	0.056	-0.020	0.026	0.065	0.004	0.033	
	26	0.005	0.049	-0.029	-0.049	0.068	-0.006	0.034	
CASP3	5	0.018	-0.077	0.025	0.022	0.092	-0.003	0.056	0.490
	12	-0.037	0.030	-0.014	-0.025	0.094	-0.011	0.058	
	26	-0.015	-0.112	-0.001	-0.054	0.094	-0.045	0.056	

Values are LSM ± SEM; 5-day group *N* = 48, *n* = 12/subgroup, 12-day group *N* = 48, *n* = 12/subgroup, 26-day group *N* = 44, *n* = 11/subgroup.

¹ ANOVA F-Test, none of the other main effects (Suppl. or Age), or interactions (Suppl x BiW; Suppl x Age; BiW x Age or Suppl x BiW x Age) were significant (*P* > 0.05).

² mRNA abundance (log-CNRQ).

³ Age; LSM values shown include all values measured within the respective age group, regardless of BiW and supplementation.

^{a,b} Labeled LSM in a row within one Birthweight group and one Age group without a common letter differ, *P* < 0.05 (Tukey-Kramer test).

^{c,d} Labeled LSM in a row within one Supplementation group and one Age group without a common letter differ, *P* < 0.05 (Tukey-Kramer test).

Abbreviations: BiW = Birthweight, CASP 3 = Caspase 3, OCLN = Occludin, PCNA = Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen, Suppl = Supplementation, TJP1 = Tight junction protein 1, TJP2 = Tight junction protein 2.

4.4.6. Amino acid and glutathione concentration in plasma and jejunal tissue

Free amino acid concentration in plasma.

There was an effect of Suppl on the plasma concentration of Ala, Arg, Gln and Pro, while BiW affected Orn and Pro concentration. Age influenced the concentration of all evaluated AAs (Table 6). At age day 12, the plasma Ala concentration was higher in Ala supplemented compared to Gln supplemented piglets ($P < 0.001$), the concentration of Arg and Gln was higher in NBW-Gln compared to NBW-Ala ($P = 0.023$), and the concentration of Ala was higher in LBW-Ala than in NBW-Ala ($P = 0.001$). The concentration of all investigated AAs as well as the concentration of the nonproteinogenic citrulline and Orn was higher in the 12-day group ($P < 0.001$), whereas the concentration of Glu was higher in 26-day group ($P < 0.001$).

Free amino acid and amino acid metabolite concentration in jejunal tissue.

In jejunal tissue, the concentration of Gln was affected by BiW, whereas Age affected all other parameters with exception of citrulline, Pro, and Orn. The interaction of Suppl x BiW x Age affected Gln concentration. The concentration of Ala, Arg, Gln and Pro was higher in the 12-day group ($P < 0.001$), while the concentration of Glu was higher in the 26-day group ($P < 0.001$) (Table 6).

Protein bound amino acid and glutathione concentration in jejunal tissue.

The factor Age affected all measured parameters, whereas the interaction Suppl x BiW x Age influenced total protein concentration. On age day 26 the total protein concentration was lower in LBW-Gln than LBW-Ala ($P = 0.026$), whereas total protein concentration was lower in LBW-Gln than NBW-Gln ($P = 0.024$) (Table 6). The factors BiW and Age influenced the concentration of glutathione. On age day 12 the concentration of glutathione was higher in LBW-Ala than in NBW-Ala ($P = 0.042$). The total GSH concentration was higher in the 12-day group than in 26-day group ($P = 0.014$).

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Table 6. Acute (12-day group) and persistent (26-day group) effects of an early life (day 1–12) glutamine (Gln) or alanine (Ala) supplementation on the concentration of free and protein-bound amino acids (FAA, PBAA), in plasma and jejunal tissue as well as the concentration of glutathione in jejunal tissue in low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets.

Item	Age (day)	Ala		Gln		SEM	Age ²	SEM	P-Value ¹					
		LBW	NBW	LBW	NBW				Suppl	BiW	Age	Interaction ³		
Plasma FAA (µmol/L)	Ala	12	1297 ^{a, c}	1093 ^{a, d}	652 ^b	705 ^b	86.7	937 ^A	54.6	< 0.001	0.793	< 0.001	0.230	
		26	731	742	733	820	86.3	756 ^B	52.6					
	Arg	12	183	155 ^b	190.5	200 ^a	13.0	182 ^A	7.74	0.034	0.942	0.001	0.490	
		26	99.7	98.9	90.6	87.3	13.1	94.1 ^B	7.58					
	Cit	12	119	119	132	129	9.13	124 ^A	6.21	0.374	0.395	< 0.001	0.689	
		26	83.6	76.9	76.8	70.9	8.97	77.0 ^B	5.88					
	Gln	12	522	536 ^b	627	681 ^a	50.3	592 ^A	32.1	< 0.001	0.716	< 0.001	0.714	
		26	552	544	507	587	50.0	547 ^B	30.8					
	Glu	12	218	198	218	221	14.9	214 ^B	21.3	0.213	0.267	< 0.001	0.771	
		26	342	342	353	373	14.1	353 ^A	20.9					
	Orn	12	94.9	83.2	98.0	88.1	7.46	91.1 ^A	4.96	0.983	0.041	< 0.001	0.675	
		26	63.4	55.5	55.5	54.7	7.36	57.3 ^B	4.72					
	Pro	12	863	747	742	703	123	764 ^A	85.4	0.042	0.111	< 0.001	0.667	
		26	566	455	469	557	121	512 ^B	80.6					
	Jejunum FAA (µmol/g FM)	Ala	12	3.89	4.17	4.11	3.71	0.41	3.97 ^A	0.241	0.736	0.595	< 0.001	0.056
			26	2.64	3.13	2.96	2.80	0.41	2.88 ^B	0.236				
		Arg	12	1.61	1.79	2.02	1.86	0.255	1.82 ^A	0.162	0.362	0.738	< 0.001	0.071
			26	0.496	0.718	0.609	0.567	0.254	0.598 ^B	0.156				
Cit		12	12	0.192	0.207	0.230	0.201	0.022	0.207	0.893	0.189	0.890	0.467	
		26	26	0.203	0.238	0.187	0.183	0.022	0.203					
Gln		12	1.60	1.83	2.13	1.95	0.229	1.87 ^A	0.15	0.736	0.015	< 0.001	0.041	
		26	0.954	1.10	1.01	1.05	0.226	1.03 ^B	0.14					
Glu		12	6.69	7.29	7.35	6.69	0.538	7.00 ^B	0.309	0.015	0.898	< 0.001	0.405	
		26	8.50	8.68	8.47	9.21	0.545	8.72 ^A	0.306					
		12	0.079	0.079	0.075	0.063	0.013	0.074	0.007					

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

	Orn	26	0.082	0.074	0.080	0.049	0.014	0.071	0.007	0.683	0.439	0.812	0.532	
	Pro	12	2.47	2.82	3.34	2.91	0.53	2.89 ^A	0.31	0.683	0.439	0.812	0.095	
		26	1.41	1.87	1.91	1.79	0.54	1.74 ^B	0.30					
Jejunum PBAA (µmol/g FM)	Ala	12	42.4	42.7	44.7	40.7	13.4	42.6	7.20	0.660	0.196	< 0.001	0.973	
		26	47.0	48.9	49.3	48.6	13.8	48.4	7.30					
	Arg	12	29.9	30.2	31.0	28.3	8.75	29.9	4.78	0.660	0.196	< 0.001	0.924	
		26	33.2	33.5	33.8	33.4	8.95	33.2	4.81					
	Gln	12	24.4	24.5	25.6	23.4	6.93	24.5	3.72	0.325	0.181	< 0.001	0.894	
		26	26.8	28.0	27.9	27.8	7.11	27.6	3.76					
	Glu	12	38.6	39.6	41.6	38.1	12.9	39.5	6.56	0.392	0.200	< 0.001	0.927	
		26	43.2	45.6	45.7	44.7	13.4	44.8	6.56					
	Pro	12	27.6	23.7	26.4	23.9	17.6	25.4	10.2	0.075	0.544	< 0.001	0.831	
		26	25.4	25.6	27.6	27.0	17.8	26.4	10.1					
	Jejunum Total Protein (g/g FM)		12	0.084	0.083	0.087	0.084	0.003	0.084 ^B	0.001	0.744	0.721	< 0.001	0.015
			26	0.111 ^a	0.110	0.106 ^{b,c}	0.114 ^d	0.003	0.111 ^A	0.001				
Jejunum Glutathione (µmol/ g Protein)		12	15.5 ^c	12.8 ^d	13.7	13.9	1.10	14.0 ^A	0.662	0.585	0.046	0.010	0.208	
		26	11.5	10.3	12.9	11.2	1.05	11.5 ^B	0.627					

Values are LSM ± SEM; 12-day group $N = 48$, $n = 12$ /subgroup, 26-day group $N = 44$, $n = 11$ /subgroup.

^{a,b} Labeled LSM in a row within one Birthweight group and one Age-group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

^{c,d} Labeled LSM in a row within one Supplementation group and one Age-group without a common letter differ, $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

A–B indicate significant differences among Age groups $P < 0.05$ (Tukey–Kramer test).

¹ ANOVA F-Test, none of the other interactions (Suppl x BiW, Suppl x Age, BiW x Age) were significant ($P > 0.05$).

² Age; LSM values shown include all values measured within the respective Age group, regardless of BiW and supplementation.

³ Interaction Suppl x BiW x Age.

Abbreviations: BiW = Birthweight, Cit = Citrulline, FM = Fresh matter, Orn = Ornithine, Suppl = Supplementation.

4.5. Discussion

There is limited research on the effects of pre-weaning nutritional support on development and gut health prior to weaning in piglets [1]. We have previously shown that the supplementation of Gln from age day 1 to 12 increased growth and milk intake in LBW piglets which was associated to changes in lipid metabolism suggesting Gln effects on the splanchnic tissue [31]. Additionally, in a companion paper we reported that Gln supplementation resulted in Gln accumulation in skeletal muscle of 5-day old piglets and that Gln supplementation was associated with larger muscle fibers [42], as well as higher cellular proliferation in skeletal muscle [43]. Collectively, these results appear to support earlier findings on the growth-promoting effect of glutamine in pre-weaning piglets [21,22]. Therefore, the aims of this study were (1) to explore whether the growth advantage of Gln-supplemented LBW piglets during the acute phase of supplementation (age day 1 to 12) persists as “carry-over-effect” after supplementation has ended, and (2) if this was associated with changes in jejunal development and maturation.

There is limited research on the effects of pre-weaning nutritional support on development and gut health prior to weaning in piglets [1]. We have previously shown that the supplementation of Gln from age day 1 to 12 increased growth and milk intake in LBW piglets which was associated to changes in lipid metabolism suggesting Gln effects on the splanchnic tissue [31]. Additionally, in a companion paper we reported that Gln supplementation resulted in Gln accumulation in skeletal muscle of 5-day old piglets and that Gln supplementation was associated with larger muscle fibers [42], as well as higher cellular proliferation in skeletal muscle [43]. Collectively, these results appear to support earlier findings on the growth-promoting effect of glutamine in pre-weaning piglets [21,22]. Therefore, the aims of this study were (1) to explore whether the growth advantage of Gln-supplemented LBW piglets during the acute phase of supplementation (age day 1 to 12) persists as “carry-over-effect” after supplementation has ended, and (2) if this was associated with changes in jejunal development and maturation.

4.5.1. Comparison among supplementation groups

In the current study, LBW piglets supplemented with Gln were heavier than their Ala supplemented littermates until age day 21, 9 days after the cessation of supplementation. Analysis of jejunal samples collected on the final supplementation day (12) and two weeks after cessation of supplementation (26 days), showed only minimal effects of Gln

supplementation on jejunal morphology, cellular populations, tissue AA and glutathione concentrations, consistent with results previously published by our group [32], investigating piglets during the supplementation period (age days 5 and 12). Additionally, only minor effects of Gln supplementation on jejunal cellular proliferation and tight junction protein mRNA abundance were observed in piglets during (5 and 12 days) and after cessation of supplementation (26 day). Except for increased VH and ratio of VH to CD in 12-day old LBW piglets supplemented with Gln compared to Ala littermates, none of the observed differences could explain the improved growth performance of LBW piglets supplemented with Gln. We have previously discussed this in detail [32], focusing on two main hypotheses. Since Gln supplementation did not increase jejunal digesta Gln concentrations [32], we assumed that Gln was absorbed, as indicated by the increased concentration of free Gln and related AA in the jejunum tissue of 12- vs. 26-day group piglets, but might have affected intestinal development in more proximal sections of the SI. Alternatively, Gln may exert its beneficial effects on the SI rather in stressed or diseased animals [44]. It seems that low birthweight itself, even below the lowest quartile birthweight category and with lower survival probability [33,34], does not compromise SI function and development to the extent that Gln could have a beneficial effect.

The increase in VH and VH to CD ratio observed in this study might be an indicator for an increase of mucosal surface [24]. Morphologic measurements have been used as markers of absorptive capacity [45] and it has been shown that Gln supplementation improved absorptive capacity in weaned piglets [46]. Improved absorptive capacity could be a transient advantage for the growth of LBW piglets supplemented with Gln compared to those supplemented with Ala. However, it cannot be excluded that improved growth was also associated to a higher milk intake observed from day 11 to 12 shortly before cessation of Gln supplementation as reported [31]. In contrast, in the current study we found that at age day 26 LBW piglets supplemented with Gln consumed equal amounts of milk as LBW supplemented with Ala, suggesting that there is no sustained effect of Gln on milk intake. This may explain why the BW of LBW piglets supplemented with Gln was no longer higher than that of Ala supplemented LBW littermates at the age of day 26. In another study Gln supplementation was not associated with differences in milk intake of suckling piglets [22]. In addition, energy, and nutrient intake at age day 26 did not come exclusively from milk, because piglets had access to solid feed between age 14 to 26 days, which may have contributed to better piglet growth [1] but could not be quantified in the present study. Indeed individual creep feed intake could have also explained the observed differences in TJP mRNA abundance, cell proliferation and goblet cell abundance at age day 26. It was shown that individual creep feed intake in suckling piglets was negatively correlated with the number of PCNA-positive cells and the ratio of VH to CD in jejunal tissue [47],

indicating that differences in individual creep feed intake can affect jejunal development irrespective of glutamine supplementation. However, in another study the supplementation of glutamine-enriched creep feed (1%) pre-weaning (age 14–21 days) and of feed during 3 weeks post-weaning improved the feed conversion ratio compared to controls (standard creep feed) but did not affect the litter-based feed intake [46].

It has been shown that glutamine increased the rate of cell proliferation in porcine intestinal cell culture as well as TJP transcript abundance and protein levels, while it decreased paracellular permeability (IPEC cells) [7,48]. However, the results of our *in vivo* studies do not support these findings. We also analyzed fractional protein synthesis rate in the jejunum of the same piglets but likewise did not observe an effect of glutamine on this parameter as reported earlier [32]. This is in contrast to reports showing beneficial effects of glutamine on fractional protein synthesis rate in porcine intestinal cell culture [49]. Presumably, the reason for the discrepancies between *in vitro* glutamine supplementation studies, and our *in vivo* study is the concentration of glutamine. In the cell cultures, glutamine concentrations were 2–8 times higher than the plasma glutamine concentrations in our Gln supplemented piglets [31]. Therefore, translation of *in vitro* to *in vivo* studies examining the effects of glutamine is difficult because it is assumed that effects found *in vitro* can be reproduced *in vivo*, although the systemic conditions are fundamentally different.

4.5.2. Comparison among birthweight groups

Throughout the study, LBW piglets from both supplementation groups remained smaller and lighter than their NBW littermates, whilst small differences in jejunal morphology, cellular population, and proliferation, TJP transcript abundance and glutathione concentration were observed between LBW and NBW piglets. However, these differences did not allow conclusions regarding systematic developmental differences between LBW and NBW piglets in the jejunum. Other studies in piglets of similar age to the current study showed that LBW was not associated with impairment of SI morphology, cellular proliferation, or goblet cell abundance [50,51] This observation is confirmed by our study. However, there is conflicting evidence on whether BiW affects jejunal barrier function [51,52]. In this study we detected an effect of BiW on the transcript abundances of TJP1, TJP2 and OCLN. However, impaired barrier function has been associated with higher [53] and lower TJP transcript abundance [52]. Both higher and lower TJP transcript abundance has been linked to elevated interleukin levels [53] or higher oxidative stress [52]. In our experiment altered TJP mRNA levels were not associated with lower glutathione concentrations in jejunal tissue, changes in TJP location or

increased immigration of inflammatory cells. There is also conflicting evidence whether LBW impairs glutathione metabolism in jejunal tissue during the suckling period [32,52]. Low birthweight has been associated with lower abundance of intraepithelial lymphocytes [54], however this could not be confirmed in the current study. This might be due to the fact that in the study of Prims et al. 2016 [54] other subsets of intraepithelial lymphocytes (CD8+ and CD4+ lymphocytes) were determined. Different subsets of lymphocytes fulfill diverging functions in the mucosal immunity and a pan intraepithelial lymphocyte marker has not been established [55]. Thus to assess how a low birthweight affects the development of jejunal mucosal immunity is challenging because different subpopulations of intraepithelial lymphocytes with different functions are compared. Together the results of the current study suggest that LBW piglets that survive the first days after birth do not have impaired intestinal development if they consume sufficient amounts of colostrum [24].

4.5.3. Comparison among age groups

The factor Age showed the clearest effect on the measured intestinal parameters among all factors analyzed in this study. In previous studies parameters of small intestinal development such as morphology [55], cell populations or barrier function [16] differ between the first and the fourth week of life in suckling pigs. It has been known for some time that jejunal cellular proliferation is higher in the fourth week of life than in the first and has been associated with a lower susceptibility of older suckling piglets to enteral viral infections [56]. Results from this study confirm that cellular proliferation increases during the suckling period, regardless of birthweight. Piglets are born without an acquired immune system and an incomplete mucosal immunity therefore rely on immunoglobulin intake from maternal colostrum [57]. Under commercial conditions, piglets are weaned with an incompletely adapted enteric immune system [1,57]. Our IHC-analysis shows that the number of intraepithelial lymphocytes was higher in the 26-day group than in the 12-day group but the number of intraepithelial lymphocytes is still lower than in adult pigs, suggesting that the development of the intestinal mucosa is not yet complete [58]. A similar porcine developmental pattern has also been described by others [59]. In addition, intraepithelial lymphocytes have been shown to migrate into the jejunal mucosa after birth and this process is also regulated by the uptake of colostrum bioactive macromolecules [58]. Additional factors have been identified that influence jejunal development, including ontogenetic factors, dietary changes and microbiome composition [16]. As sow milk yield peaks in the third week of lactation and becomes limiting thereafter [60], additional creep feed is commonly offered to suckling piglets preparing them for weaning and supporting their growth [1]. There is evidence that creep feed might influence jejunal

morphometry independent of the jejunal microbial population [47]. In contrast, jejunal mucosal development was shown to be correlated negatively with the Enterobacteriaceae population in the jejunum [16], while the effect of age on total microbial population was less distinct in jejunum than in colon. A companion study using the same animals as in this report and examining developmental parameters of the colon, including mucosa architecture and colon microbiota, also showed that age had the greatest effect among all influencing factors examined [61]. Based on current knowledge, the exact mechanisms of jejunal development are still unclear and warrant further research. The observed differences in jejunal mucosal morphology, cell population and proliferation might therefore be related to the influence of a combination of ontogenetic factors, dietary changes and possibly microbial factors.

4.6. Conclusion

This study showed that oral Gln supplementation between age days 1 to 12 improved the BW of LBW piglets compared to Ala-supplemented LBW littermates from day 12 to day 21 of age. However, Gln had a very limited effect on parameters of morphology, TJP transcript abundance, and oxidative status in jejunal tissue. We found little evidence that low BiW affected the measured jejunal parameters under the current experimental conditions. As other studies have shown, the jejunum develops rapidly during suckling, suggesting that ontogenetic factors have a more significant influence on intestinal development than BiW and Gln supplementation. This study provides further evidence that neonatal Gln supplementation can improve the growth of pre-weaning LBW piglets, and additional studies should be conducted to understand the metabolic fate of Gln in suckling piglets underpinning this observation.

4.7. Acknowledgments

We thank the staff of the Experimental Animal Facility for Pigs at the Research Institute for Farm Animal Biology (FBN) for their support in conducting the animal experiment. The authors are grateful to K. Schröter and L. Ebersbach (FU Berlin), B. Mielenz, V. Hofer-Pretz, K. Kaspari, U. Lüdtke, K. Gürtler, S. Foß and E. Wünsche (FBN) for excellent technical assistance.

4.8. Author Contributions

- Conceptualization: Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.
- Data curation: Armin Tuchscherer.
- Formal analysis: Johannes Schregel, Johannes Schulze Holthausen, Quentin L. Sciascia, Solvig Görs, Zeyang Li, Armin Tuchscherer, Elke Albrecht.
- Funding acquisition: Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.
- Investigation: Johannes Schregel, Johannes Schulze Holthausen, Quentin L. Sciascia, Elke Albrecht.
- Methodology: Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.
- Project administration: Cornelia C. Metges. Supervision: Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges. Writing – original draft: Johannes Schregel.
- Writing – review & editing: Quentin L. Sciascia, Jürgen Zentek, Cornelia C. Metges.

4.9. References

1. Huting AMS, Middelkoop A, Guan X, Molist F. Using Nutritional Strategies to Shape the Gastro-Intestinal Tracts of Suckling and Weaned Piglets. *Animals*. 2021; 11(2). Epub 2021/02/11. <https://doi.org/10.3390/ani11020402> PMID: 33562533; PubMed Central PMCID: PMC7914898.
2. Hales J, Moustsen VA, Nielsen MB, Hansen CF. Individual physical characteristics of neonatal piglets affect preweaning survival of piglets born in a noncrated system. *J. Anim. Sci.* 2013; 91(10):4991–5003. Epub 2013/10/01. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5740> PMID: 24078619.
3. Marchant JN, Rudd AR, Mendl MT, Broom DM, Meredith MJ, Corning S, et al. Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems. *Vet. Rec.* 2000; 147(8):209–14. Epub 2000/09/20. <https://doi.org/10.1136/vr.147.8.209> PMID: 10994922.
4. D’Inca R, Gras-Le Guen C, Che L, Sangild PT, Le Huerou-Luron I. Intrauterine growth restriction delays feeding-induced gut adaptation in term newborn pigs. *Neonatology*. 2011; 99(3):208–16. Epub 2010/10/01. <https://doi.org/10.1159/000314919> PMID: 20881437.
5. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin. Med. Insights. Pediatr.* 2016; 10:67–83. Epub 2016/07/22. <https://doi.org/10.4137/CMPed.S40070> PMID: 27441006; PubMed Central PMCID: PMC4946587.
6. Huygelen V, De Vos M, Willemsen S, Tambuyzer B, Casteleyn C, Knapen D, et al. Increased intestinal barrier function in the small intestine of formula-fed neonatal piglets. *J. Anim. Sci.* 2012; 90 Suppl 4:315–7. Epub 2013/02/13. <https://doi.org/10.2527/jas.53731> PMID: 23365365.
7. Kim MH, Kim H. The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(5). Epub 2017/05/13. <https://doi.org/10.3390/ijms18051051> PMID: 28498331; PubMed Central PMCID: PMC5454963.
8. Verdile N, Mirmahmoudi R, Brevini T, Gandolfi F. Evolution of pig intestinal stem cells from birth to weaning. *Animal* 13: 2830–2839. 2019. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001319> PMID: 31199215

9. Yang H, Xiong X, Wang X, Yin Y. Mammalian target of rapamycin signaling pathway changes with intestinal epithelial cells renewal along crypt-villus axis. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 39(2):751–9. <https://doi.org/10.1159/000445665> PMID: 27459644
10. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2019; 16(1):19–34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y> PMID: 30429586
11. Krndija D, El Marjou F, Guirao B, Richon S, Leroy O, Bellaiche Y, et al. Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut. *Science*. 2019; 365(6454):705–10. <https://doi.org/10.1126/science.aau3429> PMID: 31416964
12. Gordon JI, Schmidt GH, Roth KA. Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric, and transgenic mice¹. *FASEB J*. 1992; 6(12):3039–50. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.12.1521737>.
13. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas (13th ed.)*, New York: McGraw-Hill Medical; 2013.
14. Tarabova L, Makova Z, Piesova E, Szabo´ova´ R, Faixova´ Z. Intestinal Mucus Layer and Mucins (A Review). *Folia Vet*. 2016;60. <https://doi.org/10.1515/fv-2016-0003>
15. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin.* 2001; 73(6):1131S–41S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1131S> PMID: 11393191
16. Arnaud AP, Rome V, Richard M, Formal M, David-Le Gall S, Boudry G. Post-natal co-development of the microbiota and gut barrier function follows different paths in the small and large intestine in piglets. *FASEB J*. 2020; 34(1):1430–46. Epub 2020/01/10. <https://doi.org/10.1096/fj.201902514R> PMID: 31914707.
17. Święch E, Tuśnio A, Taciak M, Barszcz M. Modulation of Mucin Secretion in the Gut of Young Pigs by Dietary Threonine and Non-Essential Amino Acid Levels. *Animal*. 2022; 12(3). Epub 2022/02/16. <https://doi.org/10.3390/ani12030270> PMID: 35158594; PubMed Central PMCID: PMC8833754.
18. Gustafsson JK, Johansson MEV. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2022; 19(12):785–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00675-x> PMID: 36097076
19. Quintana-Hayashi MP, Venkatakrishnan V, Haesebrouck F, Linde´n S. Role of Sialic Acid in *Brachyspira hyodysenteriae* Adhesion to Pig Colonic Mucins. *Infect. Immun*. 2019; 87(7). Epub 2019/04/17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00889-18> PMID: 30988055; PubMed Central PMCID: PMC6589055.

20. Ehsanullah M, Filipe MI, Gazzard B. Mucin secretion in inflammatory bowel disease: correlation with disease activity and dysplasia. *Gut*. 1982; 23(6):485–9. Epub 1982/06/01. <https://doi.org/10.1136/gut.23.6.485> PMID: 7076023; PubMed Central PMCID: PMC1419694.
21. Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Knabe DA, Burghardt RC, Spencer TE, et al. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *J. Anim. Sci.* 2011;S89(7):2017–30. Epub 2010/12/21. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3614> PMID: 21169511.
22. Haynes TE, Li P, Li X, Shimotori K, Sato H, Flynn NE, et al. L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes. *Amino acids*. 2009; 37(1):131–42. Epub 2009/02/04. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0243-x> PMID: 19189199.
23. Farmer C. *The Suckling and Weaned Piglet*. 1st ed. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2020.
24. Everaert N, Van Cruchten S, Westrom B, Bailey M, Van Ginneken C, Thymann T, et al. A review on early gut maturation and colonization in pigs, including biological and dietary factors affecting gut homeostasis. *Anim Feed Sci Tech*. 2017; 233:89–103. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.011> WOS:000418629000010.
25. Pluske JR, Turpin DL, Kim JC. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Anim Nutr*. 2018; 4 (2):187–96. Epub 2018/08/25. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004> PMID: 30140758; PubMed Central PMCID: PMC6104527.
26. Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 2017; 3(4):313–21. Epub 2018/05/17. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003> PMID: 29767141; PubMed Central PMCID: PMC5941262.
27. Moeser AJ, Klok CV, Ryan KA, Wooten JG, Little D, Cook VL, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am J Physiol-Gastr L*. 2007; 292(1):G173–81. Epub 2006/08/12. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00197.2006> PMID: 16901995.
28. Pluske J. Invited review: Aspects of gastrointestinal tract growth and maturation in the preand postweaning period of pigs. 2016; 94:399–411. <https://doi.org/10.2527/jas2015-9767>

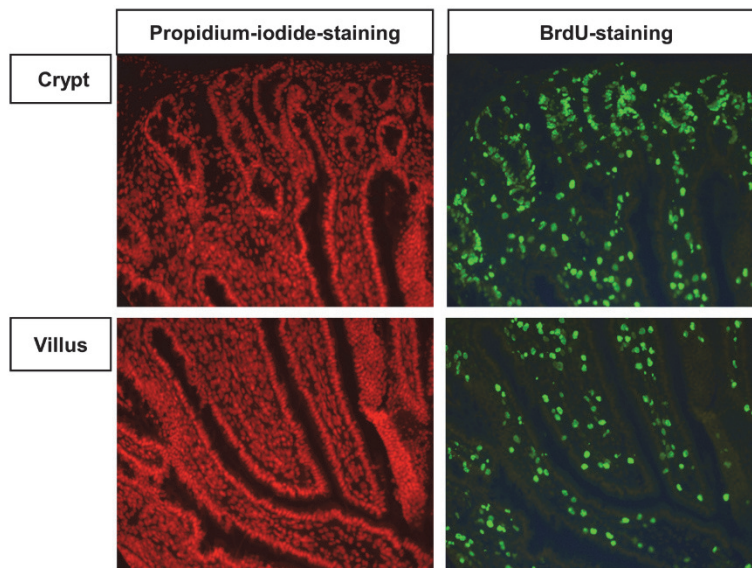
29. Ji FJ, Wang LX, Yang HS, Hu A, Yin YL. Review: The roles and functions of glutamine on intestinal health and performance of weaning pigs. *Animal*. 2019; 13(11):2727–35. Epub 2019/08/14. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001800> PMID: 31407650.
30. Luise D, Chalvon-Demersay T, Correa F, Bosi P, Trevisi P. Review: A systematic review of the effects of functional amino acids on small intestine barrier function and immunity in piglets. *Animal*. 2023:100771. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100771>.
31. Li Z, Sciascia QL, Gors S, Nguyen N, Rayatdoost Baghal F, Schregel J, et al. Glutamine supplementation moderately affects growth, plasma metabolite and free amino acid patterns in neonatal low birthweight piglets. *Br. J. Nutr.* 2022:1–32. Epub 2022/02/11. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000459> PMID: 35144703
32. Schregel J, Schulze Holthausen J, Sciascia QL, Li Z, Gors S, Eggert A, et al. Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development, and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets. *Plos One*. 2022; 17(4):e0267357. Epub 2022/04/28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267357> PMID: 35476806; PubMed Central PMCID: PMC9045636.
33. Rehfeldt C, Lang IS, Gors S, Hennig U, Kalbe C, Stabenow B, et al. Limited and excess dietary protein during gestation affects growth and compositional traits in gilts and impairs offspring fetal growth. *J Anim Sci.* 2011; 89(2):329–41. Epub 2010/10/05. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2970> PMID: 20889684.
34. Mbutia JM, Kasper C, Zenk M, Bee G, Metges CC, Das G. Prediction of piglet survival based only on birth weight or within-litter birth weight variability Book of Abstracts of the 74th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science 29; p. 214; Lyon: Wageningen Academic Publishers; 2023.
35. Waly N, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ. The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J Comp Pathol.* 2001; 124(2–3):172–82. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0450> WOS:000167132700012. PMID: 11222015
36. Hornickel IN, Kacza J, Schnapper A, Beyerbach M, Schoennagel B, Seeger J, et al. Demonstration of substances of innate immunity in the esophageal epithelium of domesticated mammals. Part I—Methods and evaluation of comparative fixation. *Acta histochem.* 2011; 113(2):163–74. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.09.009> WOS:000288888900013. PMID: 19850328

37. Schonhusen U, Floter A, Junghans P, Albrecht E, Petzke KJ, Zitnan R, et al. Morphology, proliferation, and ribonucleic acid and fractional protein syntheses in the small intestinal mucosa of young goats fed soy protein-based diets with or without amino acid supplementation. *J Dairy Sci.* 2010; 93(9):4165–79. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2917> WOS:000281115700030. PMID: 20723691
38. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 2003; 339(1):62–6. Epub 2003/03/06. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01423-4) PMID: 12618301.
39. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55 (4):611–22. Epub 2009/02/28. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> PMID: 19246619.
40. Rasch I, Gors S, Tuchscherer A, Htoo JK, Kuhla B, Metges CC. Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by DL-2-hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Increases Remethylation and Decreases Transsulfuration in Weaned Piglets. *J Nutr.* 2019; 149(3):432–40. Epub 2019/02/17. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy296> PMID: 30770540; PubMed Central PMCID: PMC6398387.
41. Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB. Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1994; 22(5):431–45. Epub 1994/10/01. <https://doi.org/10.1007/BF02353864> PMID: 7791040.
42. Zhao Y, Albrecht E, Sciascia QL, Li Z, Goers S, Schregel J, et al. Effects of Oral Glutamine Supplementation on Early Postnatal Muscle Morphology in Low and Normal Birth Weight Piglets. *Animals* 2020; 10 (11). Epub 2020/11/01. <https://doi.org/10.3390/ani10111976> PMID: 33126436.
43. Zhao Y, Albrecht E, Stange K, Li Z, Schregel J, Sciascia QL, et al. Glutamine supplementation stimulates cell proliferation in skeletal muscle and cultivated myogenic cells of low birth weight piglets. *Sci Rep UK.* 2021; 11(1):13432. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92959-6> PMID: 34183762
44. Bertolo RF, Pencharz PB, Ball RO. A comparison of parenteral and enteral feeding in neonatal piglets, including an assessment of the utilization of a glutamine-rich, pediatric elemental diet. *JPEN-J Parenter Enter Nutr.* 1999; 23(2):47–55. Epub 1999/03/19. <https://doi.org/10.1177/014860719902300247> PMID: 10081992.

45. Christensen B, Huber LA. The effects of creep feed composition and form and nursery diet complexity on small intestinal morphology and jejunal mucosa-specific enzyme activities after weaning in pigs. *J Anim Sci.* 2022; 100(5). Epub 2022/04/16. <https://doi.org/10.1093/jas/skac138> PMID: 35426433; PubMed Central PMCID: PMC9115911.
46. Cabrera RA, Usry JL, Arrellano C, Nogueira ET, Kutschenko M, Moeser AJ, et al. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on preand post-weaning growth performance and intestinal health of piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013; 4(1):29. Epub 2013/ 08/07. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-29> PMID: 23916292; PubMed Central PMCID: PMC3765720.
47. Choudhury R, Middelkoop A, de Souza JG, van Veen LA, Gerrits WJJ, Kemp B, et al. Impact of earlylife feeding on local intestinal microbiota and digestive system development in piglets. *Sci Rep.* 2021; 11(1):4213. Epub 2021/02/20. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83756-2> PMID: 33603087; PubMed Central PMCID: PMC7892833.
48. Wang B, Wu Z, Ji Y, Sun K, Dai Z, Wu G. L-Glutamine Enhances Tight Junction Integrity by Activating CaMK Kinase 2-AMP-Activated Protein Kinase Signaling in Intestinal Porcine Epithelial Cells. *J Nutr.* 2016; 146(3):501–8. Epub 2016/02/13. <https://doi.org/10.3945/jn.115.224857> PMID: 26865645.
49. Xi PB, Jiang ZY, Dai ZL, Li XL, Yao K, Zheng CT, et al. Regulation of protein turnover by L-glutamine in porcine intestinal epithelial cells. *J Nutr Biochem* 2012; 23(8):1012–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.009> WOS:000306880100021. PMID: 22000664
50. Mickiewicz M, Zabielski R, Grenier B, Le Normand L, Savary G, Holst JJ, et al. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63(3):225–39. Epub 2012/07/14. PMID: 22791636.
51. Huygelen V, De Vos M, Willemen S, Franssen E, Casteleyn C, Van Cruchten S, et al. Age-related differences in mucosal barrier function and morphology of the small intestine in low and normal birth weight piglets. *J Anim Sci.* 2014; 92(8):3398–406. Epub 2014/07/10. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7742> PMID: 25006062.
52. Wang W, Degroote J, Van Ginneken C, Van Poucke M, Vergauwen H, Dam TM, et al. Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes. *FASEB J.* 2016; 30(2):863–73. Epub 2015/10/31. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274779> PMID: 26514167.

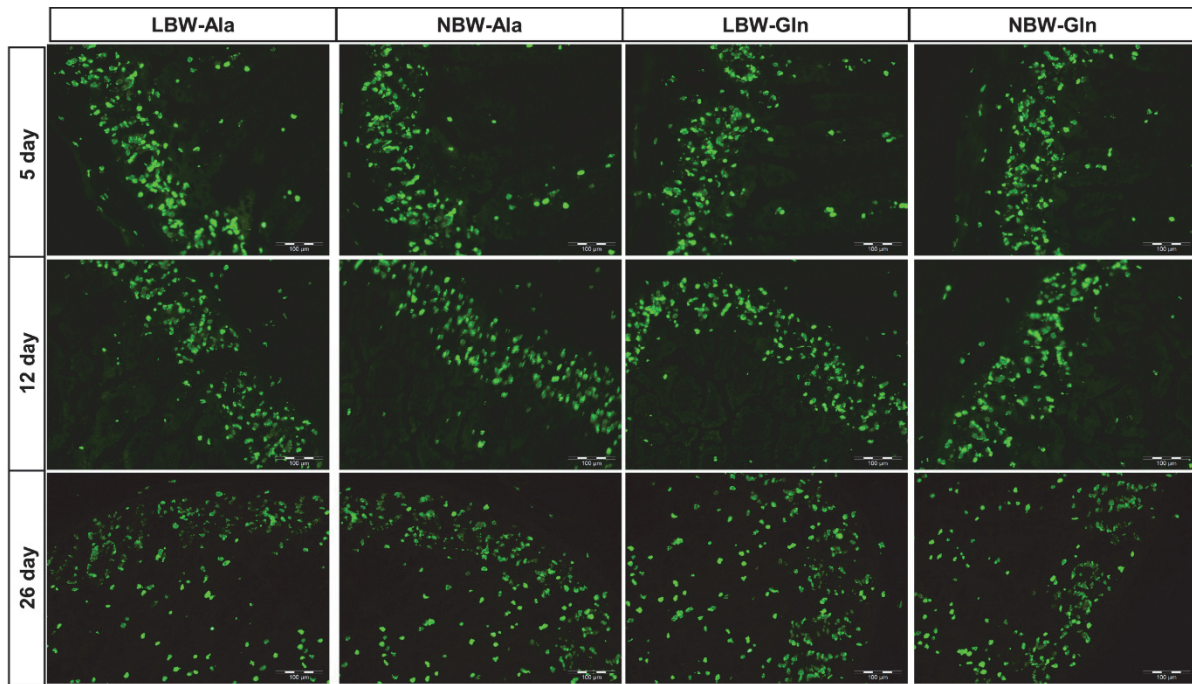
53. Villago´mez Estrada S, Pe´rez J, Melo D, Gonza´lez-Sole´ F, D’Angelo M, Pe´rez-Cano F, et al. Short Communication: Body weight of newborn and suckling piglets affects their intestinal gene expression. *J Anim Sci.* 2022;100. <https://doi.org/10.1093/jas/skac161> PMID: 35511683
54. Prims S, Tambuyzer B, Vergauwen H, Huygelen V, Van Cruchten S, Van Ginneken C, et al. Intestinal immune cell quantification and gram type classification of the adherent microbiota in conventionally and artificially reared, normal and low birth weight piglets. *Livest Sci.* 2016; 185:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.01.004> WOS:000371549400001.
55. Al Masri S, Hunigen H, Al Aiyani A, Rieger J, Zentek J, Richardson K, et al. Influence of age at weaning and feeding regimes on the postnatal morphology of the porcine small intestine. *J Swine Health Prod.* 2015; 23(4):186–203. WOS:000357067000004.
56. Moon HW. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J Am Vet Med Assoc.* 1978; 172(4):443–8. Epub 1978/02/15. PMID: 203563
57. Wiarda JE, Loving CL. Intraepithelial lymphocytes in the pig intestine: T cell and innate lymphoid cell contributions to intestinal barrier immunity. *Front Immunol.* 2022; 13:1048708. Epub 2022/12/27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1048708> PMID: 36569897; PubMed Central PMCID: PMC9772029.
58. Rothkötter HJ. Anatomical particularities of the porcine immune system—a physician’s view. *Dev Comp Immunol.* 2009; 33(3):267–72. Epub 2008/09/09. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.06.016> PMID: 18775744.
59. Rothkötter H, Möllhoff S, Pabst R. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand J Immunol.* 1999; 50(1):31–8. Epub 1999/07/15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00557.x> PMID: 10404049.
60. Hansen AV, Strathe AB, Kebreab E, France J, Theil PK. Predicting milk yield and composition in lactating sows: a Bayesian approach. *J Anim Sci.* 2012; 90(7):2285–98. Epub 2012/02/07. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4788> PMID: 22307478.
61. Schulze Holthausen J, Schregel J, Sciascia QL, Li Z, Tuchscherer A, Vahjen W, et al. Effects of Oral Glutamine Supplementation, Birthweight and Age on Colonic Morphology and Microbiome Development in Male Suckling Piglets. *Microorganisms.* 2022; 10(10):1899. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101899> PMID: 36296176

4.10. Supplementary material



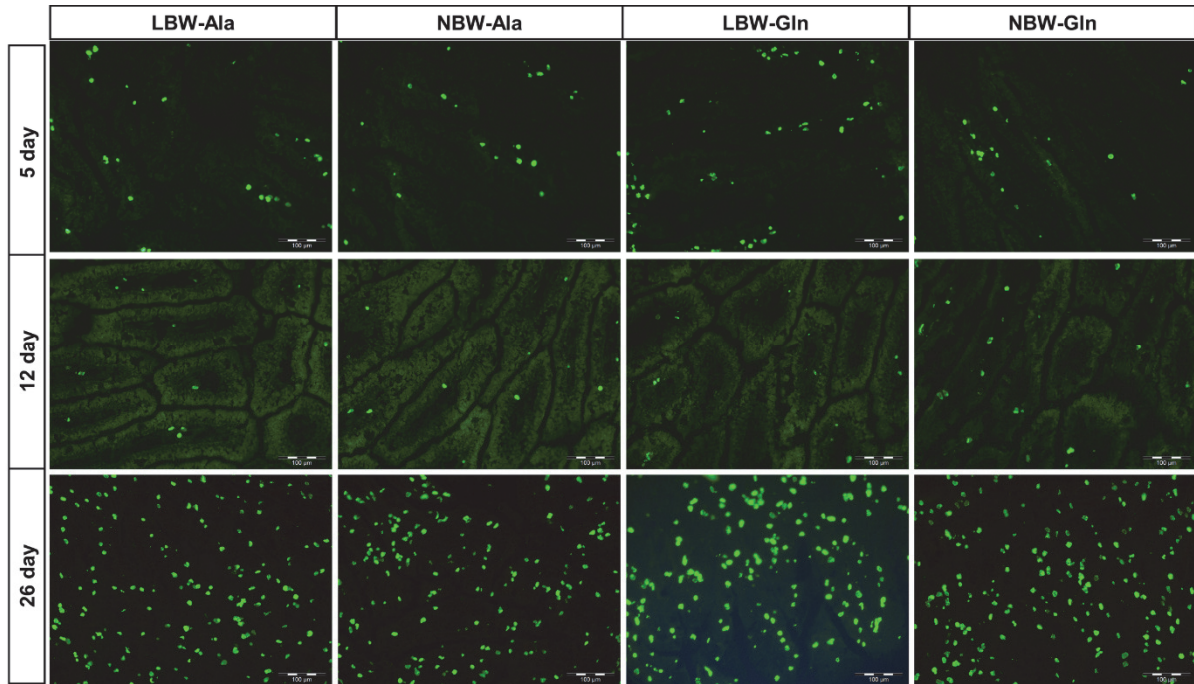
S1 Fig. Bromodeoxyuridine incorporation into proliferating jejunal cells. The upper pictures represent propidium iodide stained nuclei (red fluorescent; left) and bromodeoxyuridine incorporating nuclei (green fluorescent; right) in the section of the crypt area (100 x magnification). The lower pictures represent propidium iodide stained nuclei (red fluorescent; left) and bromodeoxyuridine incorporating nuclei (green fluorescent; right) in the section of the villus area (100x magnification).

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets



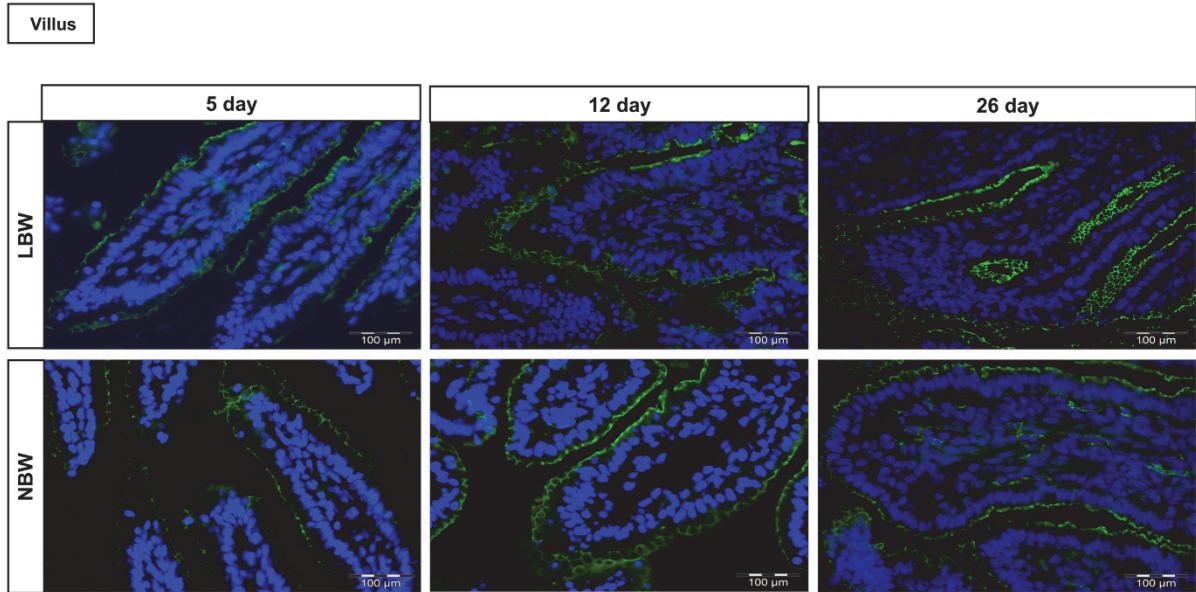
S2 Fig. Bromodeoxyuridine incorporation in the crypt area of jejunal cross sections. Bromodeoxyuridine incorporating nuclei (green fluorescent) in the crypt area of jejunal cross sections (100 x magnification) of Glutamine (Gln) and Alanine (Ala) supplemented low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets in three different age groups (5, 12, 26 days).

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets



S3 Fig. Bromodeoxyuridine incorporation in proliferating jejunal cells of the villus area. Bromodeoxyuridine incorporating nuclei (green fluorescent) in the villus area of jejunal cross sections (100 x magnification) of Glutamine (Gln) and Alanine (Ala) supplemented low (LBW) and normal birthweight (NBW) suckling piglets in three different age groups (5, 12, 26 days).

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

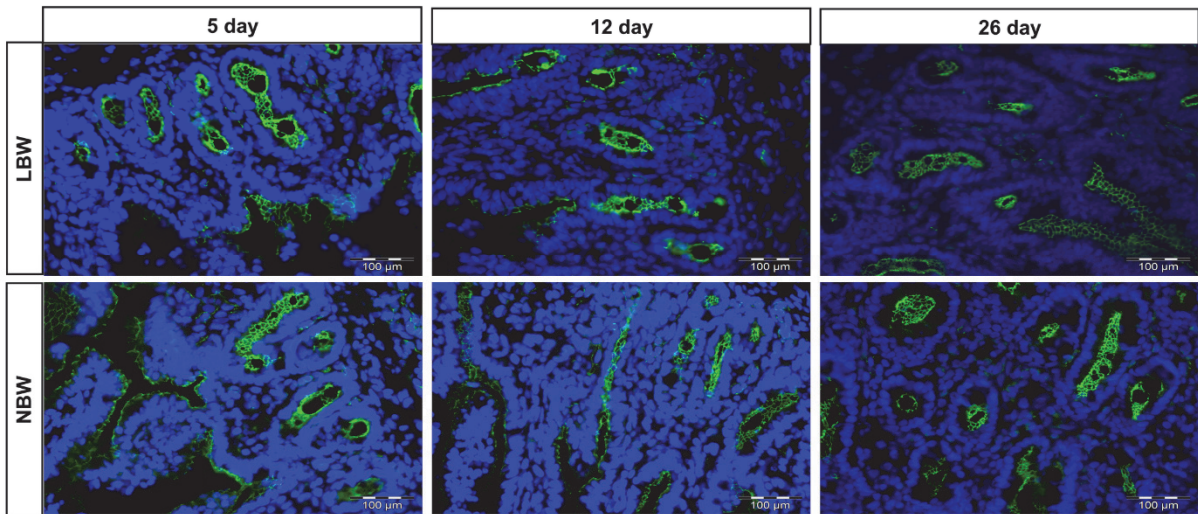


S4 Fig. Immunohistochemical images of tight junction protein 1 in the villus area of jejunal cross sections.

Immunohistochemical images of tight junction protein 1 (green) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue), scale bars represent 100 µm.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Crypt

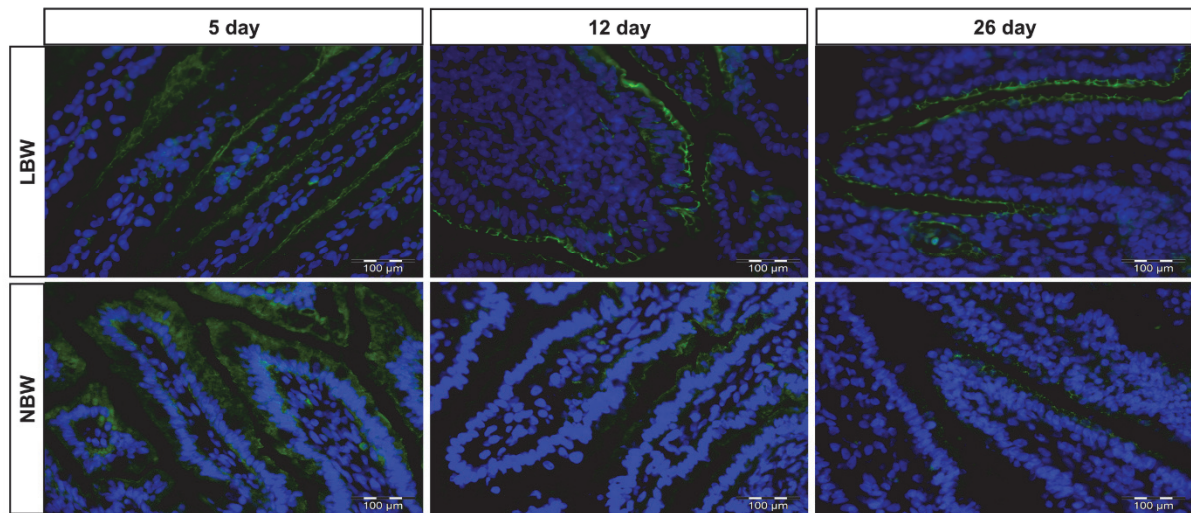


S5 Fig. Immunohistochemical images of tight junction protein 1 in the crypt area of jejunal cross sections.

Immunohistochemical images of tight junction protein 1 (green) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue), scale bars represent 100 µm.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Villus

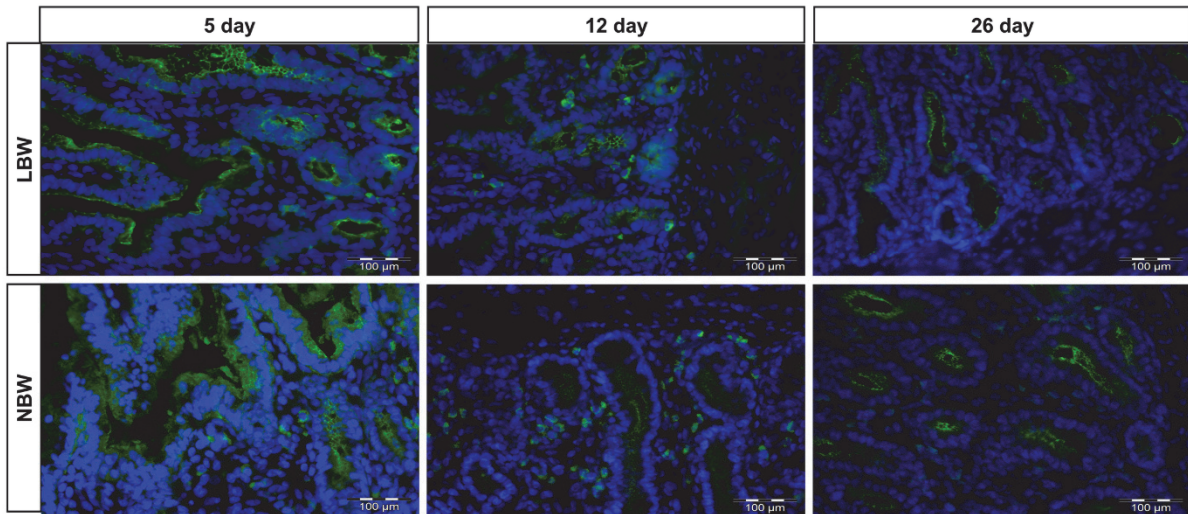


S6 Fig. Immunohistochemical images of tight junction protein 2 in the villus area of jejunal cross sections.

Immunohistochemical images of tight junction protein 2 (green) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue), scale bars represent 100 μm.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

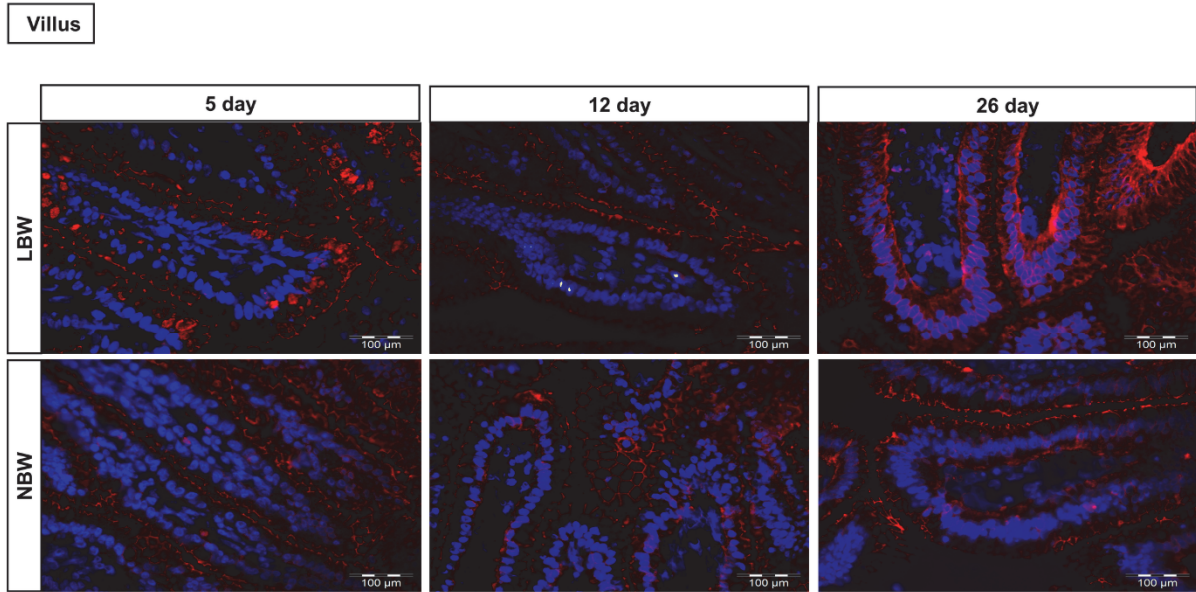
Crypt



S7 Fig. Immunohistochemical images of tight junction protein 2 in the crypt area of jejunal cross sections.

Immunohistochemical images of tight junction protein 2 (green) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue), scale bars represent 100 µm.

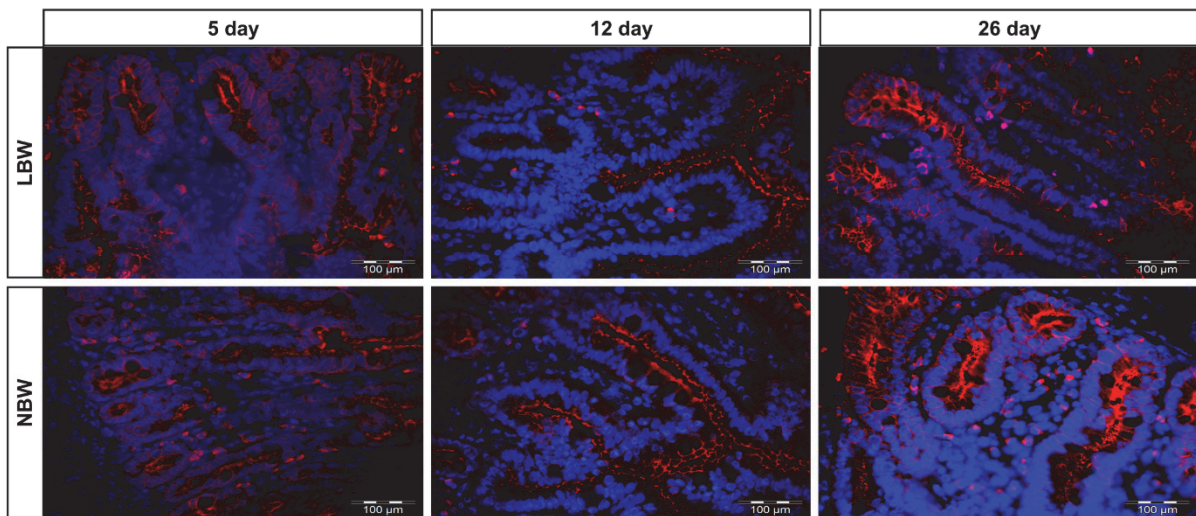
Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets



S8 Fig. Immunohistochemical images of claudin-4 in the villus area of jejunal cross sections. Immunohistochemical images of claudin-4 (red) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258, scale bars represent 100 µm.

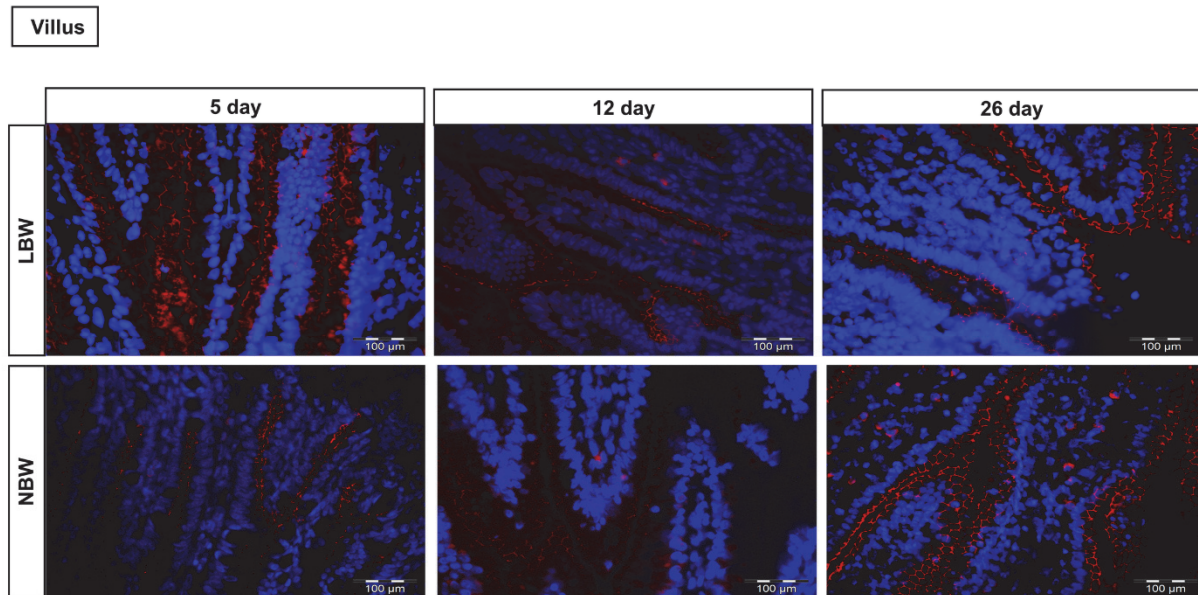
Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Crypt



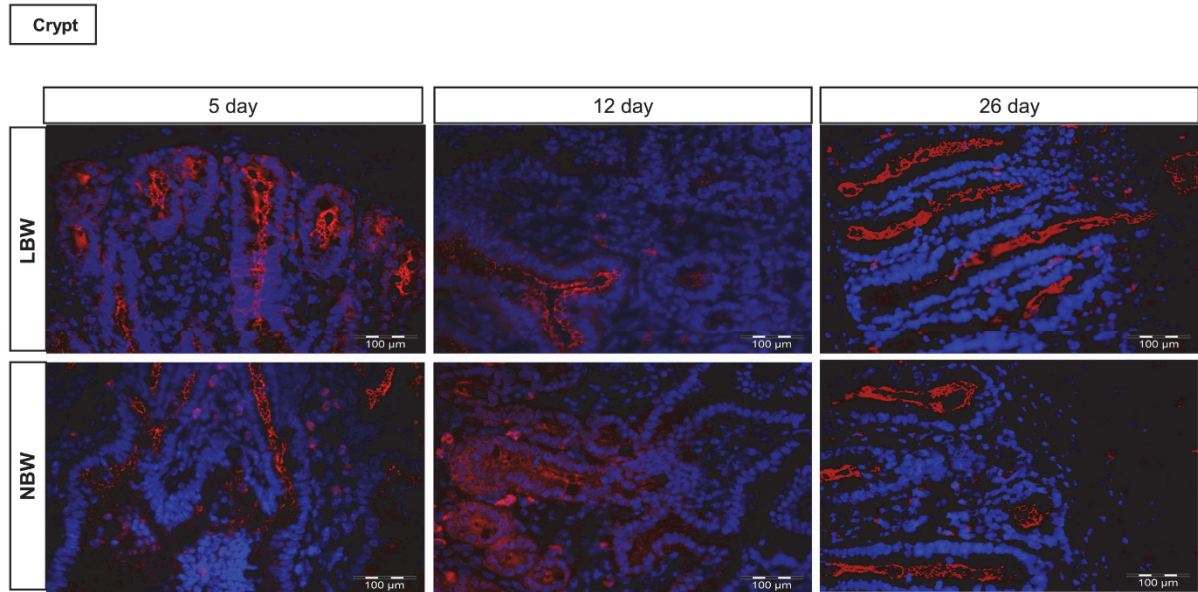
S9 Fig. Immunohistochemical images of claudin-4 in the crypt area of jejunal cross sections. Immunohistochemical images of claudin-4 (red) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258, scale bars represent 100 µm.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets



S10 Fig. Immunohistochemical images of occludin in the villus area of jejunal cross sections. Immunohistochemical images of occludin (red) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue), scale bars represent 100 µm.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets



S11 Fig. Immunohistochemical images of occludin in the crypt area of jejunal cross sections. Immunohistochemical images of occludin (red) in low and normal birthweight piglets in three different age groups (5, 12, 26 days); nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue), scale bars represent 100 µm.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

S1 Table. Nutrient composition of supplementary creep feed

Analyzed ingredients (%) ¹	
Metabolisable energy, MJ/kg	13.8
Crude protein	18.0
Crude fat	5.3
Crude fiber	4.0
Crude ash	5.5
Lysine	1.35
Methionine	0.48
Calcium	0.75
Phosphor	0.58
Sodium	0.25

Porcistart, Trede & and von Pein GmbH, Itzehoe, Germany

¹ Standardized to a dry matter content of 88%.

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

S2 Table. Primer sequences

Gene Name	Ref Seq ID	Direction and Sequence ¹	Product Size (bp)	Age (days)	Efficiency	Cq (mean)
Tight junction proteins						
Tight junction protein 1	XM_021098827.1	F'-GACCAACGTAGCTCTGGCAT R'-TGGACATAGCCTCATTGCA	192	5	1.88	25.8
				12	1.85	25.4
				26	1.88	24.4
Tight junction protein 2	XM_005660143.3	F'-TAAAGATGGCAACCTGCACGA R'-TGATGAGCGTCTGCTTGCTG	155	5	1.85	24.9
				12	1.84	27.0
				26	1.89	25.5
Claudin 4	NM_001161637.1	F'-CAACTGCGTGGATGATGAGA R'-CCAGGGGATTGTAGAAGTCG	140	5	1.86	24.9
				12	1.89	25.4
				26	1.84	24.8
Occludin	XM_005672522.3	F'-ACGAGCTGGAGGAAGACTGGATC R'-GATCCCTTAACTTGCTTCAGTCTATTG	241	5	1.88	21.2
				12	1.86	26.8
				26	1.86	24.0

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

Cellular proliferation and apoptosis

Proliferating Cell Nuclear Antigen	NM_001291925.1	F'-GTTGTCACAAACGAGTAATGTTGA R'-GCTGAACTGGTTCATTCATCTCT	71	5	1.88	25.8
				12	1.88	26.4
				26	1.95	21.1
Caspase-3	NM_214131.1	F'-GAACTCTAACTGGCAAACCCA R'-ACGCCATGTCATCTTCAGTC	105	5	1.92	23.4
				12	1.91	27.1
				26	1.93	25.7

Reference genes

Actin-beta	XM_021086047.1	F'-CACGCCATCCTGCGTCTGGA R'-AGCACCGTGTTGGCGTAGAG	100	5	1.91	18.6
				12	1.74	25.8
				26	1.83	22.8
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	XM_021079503.1	F'-GGACTTGAATCATGTTTGTG R'-CAGATGTTTCCAAACTCAAC	91	5	1.87	27.2
				12	1.82	28.0
				26	1.87	21.8
Peptidylprolyl isomerase A	NM_214353	F'-AGCACTGGGGAGAAAGGATT	220	5	1.90	18.7

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets

		R'-TCCAAGTCTTCACGGAGTTTGT		12	1.89	21.3
				26	1.82	21.3
Ribosomal protein S18	NM_213940.1	F'-GGATGTGAAGGATGGGAAGTACA	72	5	1.89	22.8
		R'-TCCAAGTCTTCACGGAGTTTGT		12	1.89	21.0
				26	1.88	17.0
Topoisomerase 2-beta	NM_001258386.1	F'-CCCAGTTGGCTGGATCTGTT	182	5	1.91	25.9
		R'-ATAACGAGGGCTTGCAGCAT		12	1.90	25.5
				26	1.86	20.9

¹ Caspase-3, Claudin 4, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1, Occludin, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Tight junction protein 1, Tight junction protein 2, were designed for this study, Actin-beta from Nygard et al., 2007 (Nygard et al. 2007), Peptidylprolyl isomerase A and Ribosomal protein S18 from Rasch et al., 2019 (Rasch et al. 2019b), and Topoisomerase 2-beta from Schregel et al., 2022 (Schregel et al. 2022)

Supplementary References

1. Nygard AB, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* 2007;8:67. Epub 2007/08/19. doi: 10.1186/1471-2199-8-67. PubMed PMID: 17697375; PubMed Central PMCID: PMCPMC2000887.
2. Rasch I, Gors S, Tuchscherer A, Viergutz T, Metges CC, Kuhla B. Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by dl-2-Hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Reduces Fractional Glutathione Synthesis in Weaned Piglets. *J. Nutr.* 2019. Epub 2019/11/28. doi: 10.1093/jn/nxz272. PubMed PMID: 31773161.
3. Schregel J, Schulze Holthausen J, Sciascia QL, Li Z, Gors S, Eggert A, et al. Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development, and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets. *Plos One.* 2022;17(4):e0267357. Epub 2022/04/28. doi: 10.1371/journal.pone.0267357. PubMed PMID: 35476806; PubMed Central PMCID: PMCPMC9045636.

4.11. Anteilerläuterung von Publikation mit alleiniger Erstautorenschaft

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Buchallik-Schregel, Johannes	Erstautor	Sammlung von Daten; Durchführung von Untersuchungen; statistische Analyse; Visualisierung; Verfassen Manuskript
Schulze Holthausen, Johannes	Co-Autor	Sammeln von Daten, Durchführung von Untersuchungen und Visualisierung
Sciascia, Quentin L.	Co-Autor	Sammlung und Auswertung von Daten, Durchführung von Untersuchungen; Statistische Analysen; Überarbeitung des Manuskriptes
Li, Zeyang	Co-Autor	Sammlung von Daten
Görs, Solvig	Co-Autor	Durchführung von Analysen
Albrecht, Elke	Co-Autor	Sammlung von Daten
Tuchscherer, Armin	Co-Autor	Statistische Analysen
Zentek, Jürgen	Co-Autor	Konzeptionierung; Betreuung, Akquise von Finanzmitteln, Überarbeitung des Manuskriptes
Metges, Cornelia C.	Co-Autor	Konzeptionierung; Betreuung, Akquise von Finanzmitteln, Überarbeitung des Manuskriptes

5. Allgemeine Diskussion

5.1. Methodische Aspekte

In den folgenden Abschnitten sollen die methodischen Probleme bzw. Fragestellungen diskutiert werden, die bei der Durchführung des Tierversuches, bei der Analyse der Gewebeproben und dem Verfassen der Manuskripte aufgetreten sind.

5.1.1. Methodische Überlegungen bei Auswahl der Kontrolldiät

Um die Effekte einer AS-Supplementierung auf das Wachstum von Schweinen zu untersuchen ist es wichtig, dass die Kontrollgruppe eine isonitrogene Diät erhält, da die Aufnahmemenge von verdaulichen Stickstoffverbindungen ein entscheidender Faktor für das Wachstum der Tiere ist (Cardinal et al. 2020). Aus diesem Grund wird bei Studien zur AS-Supplementierung bevorzugt die AS Ala verwendet (Wu et al. 2011; Getty et al. 2015; Yonke et al. 2023). Im Vergleich zu anderen AS wird Ala nicht als funktionelle Aminosäure (engl. functional amino acid) klassifiziert (Wu 2010; Chalvon-Demersay et al. 2021; Luise et al. 2023). Auch im Fall von Studien, welche die Effekte einer Gln-Supplementierung bei Ferkeln untersuchen, wird die AS Ala verwendet, um isonitrogene Diäten zu erstellen (Haynes et al. 2009; Wu et al. 2011). In bisher allen durchgeführten Studien muss berücksichtigt werden, dass die positiven Effekte von Gln in Saugferkeln bisher nur gegenüber Kontrollgruppen nachgewiesen wurden, die isonitrogene Mengen an Ala erhielten. Einerseits wird Ala zu einem viel geringeren Prozentsatz von Organen des Pfortaderkreislaufes verstoffwechselt (Stoll und Burrin 2006), andererseits kann Ala auch zu Pyruvat verstoffwechselt werden und so z. B. zur Gluconeogenese vom Organismus verwendet werden (Van Goudoever et al. 2006). Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass die positiven Effekte einer Gln-Supplementierung gegenüber einer komplexen isonitrogenen Menge eines hochverdaulichen Proteins (z. B. Molkenprotein oder Casein) oder einer isonitrogenen Menge eines Gemisches verschiedener essentieller und nicht-essentieller AS nicht hervortreten. Die Effekte von Glutamin auf Saugerfeln gegenüber einer Kontrollgruppe, die physiologische Kochsalzlösung als Kontrollsubstanz erhielt, sind bisher noch nicht untersucht bzw. publiziert worden. Weiterhin besteht das Problem, dass mit Wasser keine isonitrogene Kontrolldiät formuliert werden kann. Jedoch muss bei komplexen Proteinen wie Molkenprotein oder Casein berücksichtigt werden, dass diese Proteine lokal im Dünndarm zu einer veränderten Immunantwort und einer veränderten Schleimhautstruktur führen (Pieper et al. 2016). Die AS Ala wird in einem Großteil der Arbeiten zur Supplementierung kristalliner AS verwendet, um isonitrogene Kontrolldiäten

zu erstellen. Die dosisabhängige Wirkung von Ala auf den Organismus neonataler Ferkel wurde bisher nur unzureichend charakterisiert. Es bleibt unklar, ab welcher Menge eine Supplementierung von Ala auch zu Imbalancen im Aminosäurestoffwechsel führt und so das Wachstum der Ferkel hemmt. Diese Imbalancen wurden bei der Supplementierung anderer essentieller und nicht-essentieller AS bereits beobachtet (Haynes et al. 2009; Getty et al. 2015). Insgesamt sind die Effekte einer neonatalen Ala-Supplementierung auf Parameter wie dem Wachstum oder der Morphologie des Jejunums bei Saugferkeln nur unzureichend charakterisiert worden. Die essentielle AS Lys hingegen ist die erstlimitierende AS für das Wachstum von Schweinen (Kamphues et al. 2014; Liao et al. 2015). Auch wenn der Lys-Bedarf für Saugferkel nicht in den internationalen Tabellenwerken aufgeführt ist (Council 2012), wurde im Gegensatz zur AS Ala der Bedarf an Lys für Saugferkel in verschiedenen Studien geschätzt (1,07 g Lysin pro MJ GE, bzw. 1,12 g Lysin pro MJ GE) (GE = Gross Energy, engl. Bruttoenergie) (Auldist et al. 1997; Eisemann et al. 2014). Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass eine Supplementierung von Lys bei verschiedenen monogastrischen Spezies zu höheren Plasma-Konzentrationen von Insulin und IGF geführt hat (Liao et al. 2015). Höhere Konzentrationen von Insulin und IGF werden mit einer erhöhten FPSR in der Skelettmuskulatur in Verbindung gebracht (Davis et al. 2010). Auf die Bedeutung des Lys-Arg-Verhältnisses für das Wachstum von Saugferkeln wurde bereits in einem vorherigen Kapitel eingegangen (Kapitel 2.2.1). Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob auch positive Effekte einer Gln-Supplementierung bei anderen Kontrollgruppen zu beobachten sind, welche andere Kontroll-Supplemente als Ala erhalten haben. Außerdem bleibt die Frage zu klären, ob die Proteinmenge oder eine einzelne AS das Wachstum von Saugferkeln limitiert.

5.1.2. Allgemeine Überlegungen bei Untersuchungen an Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht

Auch wenn zahlreiche Studien weltweit den Einfluss eines niedrigen Geburtsgewichtes auf verschiedene Parameter der Entwicklung des GIT untersucht haben (Hales et al. 2013; Getty et al. 2015; Amdi et al. 2016; Thongsong et al. 2019), gibt es für Schweine im Gegensatz zum Menschen keine einheitliche Definition für LBW (Mugnier et al. 2023). Die Autoren dieser systematischen Übersichtsarbeit geben zu bedenken, dass es schwierig sei, pauschal zwischen Studien Vergleiche zu ziehen, da Schweine unterschiedlicher Genetik in unterschiedlichen geografischen Regionen und zum Teil mit unterschiedlicher Fütterung untersucht wurden (Mugnier et al. 2023). Dies sind wiederum Faktoren, die das Geburtsgewicht der Ferkel beeinflussen. Die in dieser Arbeit untersuchten Schweine stammen aus einer Population, in welcher bei Ferkeln mit einem Geburtsgewicht von 1,18 kg und darunter eine erhöhte Mortalität festgestellt wurde (Mbutia et al. 2023). Die Selektionsgrenze für Ferkel mit LBW entsprach dem untersten Quartil der untersuchten Population. Diese

Selektionsgrenzen sind relativ weit, wenn entsprechende Selektionskriterien aus der Humanmedizin verwendet werden. So liegt die Grenze für LBW in der Humanmedizin bei dem untersten zehnten Perzentil der lokalen Population (Malin et al. 2014). In anderen Studien, die sich mit der Entwicklung des Dünndarms von LBW-Ferkeln beschäftigen, wurden andere Selektionskriterien verwendet; z. B. nur Ferkel mit einem Geburtsgewicht < 1 kg und einem Geburtsgewicht, welches um 1,5 Standardabweichungen geringer war als das mittlere Geburtsgewicht des Wurfes (Huygelen et al. 2014a; Prims et al. 2016). Andererseits werden in Studien, welche die Auswirkungen von LBW auf die Darmentwicklung untersuchen, zwar Selektionsgrenzen gesetzt, aber diese stehen nicht im Zusammenhang mit der Gesamtpopulation (Mickiewicz et al. 2012; Getty et al. 2015). Eine weitere Überlegung, welche bei der Untersuchung von LBW-Ferkeln während der neonatalen Phase berücksichtigt werden sollte, wurde bereits ausführlich diskutiert und soll an dieser Stelle nur zur Vollständigkeit wiederholt werden. Zweifelsohne verenden Ferkel mit LBW häufiger in den ersten Tagen nach der Geburt (Hales et al. 2013; Amdi et al. 2016). Ferkel mit LBW, die zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden, müssen folglich die ersten Lebensstage überlebt haben und haben somit einen ersten Selektionsschritt bereits überstanden (Michiels et al. 2013; Everaert et al. 2017). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass dadurch diejenigen Ferkel nicht untersucht wurden, welche am stärksten durch IUGR betroffen sind. Gleichzeitig bleibt die Frage offen, ob Ferkel, die kurz nach der Geburt untersucht wurden und deutliche Zeichen von IUGR oder LBW zeigen (Xu et al. 1994; D'inca et al. 2011), auch zu einem späteren Zeitpunkt noch am Leben sind und somit hätten untersucht werden können.

5.1.3. Studienspezifische Überlegungen bei Untersuchungen an Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht

In der untersuchten Population wurden nur geringgradige Unterschiede in der Entwicklung des Dünndarms zwischen den Ferkeln mit niedrigem und durchschnittlichem Geburtsgewicht festgestellt. Ein Grund dafür könnte durch die gewählten Selektionsparameter der Ferkel zu erklären sein. In der vorliegenden Studie wurden nur Ferkel für die Supplementierung und für die weiteren Untersuchungen selektiert, die in den ersten 300 Minuten geboren wurden. Dieses Selektionskriterium kann dazu geführt haben, dass Ferkel aus besonders großen Würfen nicht in der Studie auftauchen, da die Geburt von 18-20 Ferkeln zum Teil länger als 300 Minuten dauern kann (Oliviero et al. 2019). Die durchschnittliche Wurfgröße in dieser Studie betrug 15,4 geborene Ferkel, wobei nur 22 % der Sauen 18 oder mehr geborene Ferkel aufwiesen. Dies kann wiederum dazu geführt haben, dass das Geburtsgewicht der selektierten LBW-Ferkel scheinbar größer war, da mit steigender Wurfgröße auch die Anzahl der LBW-Ferkel zunimmt (Huting et al. 2021).

Für die eigene Studie gilt also, dass es sich bei den untersuchten Tieren um LBW-Ferkel handelt, die nur geringe Zeichen von IUGR aufwiesen (Hales et al. 2013). Das durchschnittliche Geburtsgewicht betrug 1,1 kg und war somit um mindestens 200 g höher im Vergleich zu den Ferkeln, die in einigen früheren Studien in den ersten drei Lebenswochen untersucht wurden (Huygelen et al. 2014a; Huygelen et al. 2015; Wang et al. 2016c). Aus diesem Grund könnten die Unterschiede zwischen den beiden Geburtsgewichtsgruppen nicht groß genug gewesen sein, um auf die Entwicklung des Jejunums und des gesamten Dünndarms einen Einfluss zu haben, da in dieser Studie die Selektionsgrenzen für LBW-Ferkel möglicherweise zu hoch angesetzt waren und nicht dem Phänotyp entsprachen, der in anderen Studien in der frühen neonatalen Phase untersucht wurde (Xu et al. 1994; D'inca et al. 2010). Es wurde auch in anderen Studien beobachtet, dass LBW-Ferkel mit deutlich niedrigerem Geburtsgewicht (0.84 ± 0.21 kg, Selektionskriterium Geburtsgewicht < 1 kg und Geburtsgewicht um 1,5 Standardabweichungen geringer als das mittlere Geburtsgewicht des Wurfes) im Verlauf der Säugephase Unterschiede im BW, jedoch nicht in Bezug auf intestinale Parameter wie Morphologie, Abundanz von TJP, intestinaler Permeabilität und Apoptoserate aufwiesen (Huygelen et al. 2014a).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass andere Abschnitte des Dünndarms, die nicht in dieser Arbeit untersucht wurden, durch das niedrige Geburtsgewicht negativ beeinflusst wurden. Es wurde zuvor gezeigt, dass unterschiedliche Segmente des Dünndarms nicht im gleichen Umfang in ihrer Entwicklung von einem niedrigen Geburtsgewicht beeinflusst sind (Olszewski et al. 2021). So wurden in dieser Studie morphologische Unterschiede zwischen LBW- und NBW-Ferkeln im proximalen und mittleren Jejunum im Alter von sieben und 14 Tagen festgestellt; jedoch nicht im distalen Jejunum (Olszewski et al. 2021). Neben der Lokalisation der untersuchten Gewebe können auch die untersuchten Parameter ein Grund für die nicht vorhandenen Unterschiede in Bezug auf Parameter der jejunalen Entwicklung sein. In dieser Arbeit wurde weder die absolute Masse oder die absolute Länge des GIT noch das Gewicht oder die Länge des GIT in Relation zum BW bestimmt. Es wurde wiederholt in Studien dargelegt, dass sich LBW-Ferkel während der Säugephase hinsichtlich der absoluten Länge und des absoluten Gewichtes des GIT von NBW-Ferkeln unterscheiden (Wiyaporn et al. 2013; Huygelen et al. 2014a; Ayuso et al. 2021). Untersuchungen an Schweinen zwischen der ersten und der neunten Lebenswoche legen nahe, dass sich das Gewicht des GIT proportional zum Körpergewicht entwickelt (Adeola und King 2006). Für andere omnivore Spezies wird ein biphasisches Wachstum des GIT abhängig vom BW beschrieben (Sakata und Setoyama 1997). Zum Beispiel ist die Entwicklung des GIT bei Ratten dadurch gekennzeichnet, dass die Wachstumsrate des GIT während der Säugezeit im Vergleich zum gesamten Körper größer ist und die Wachstumsrate des GIT nach dem Absetzen reduziert ist (Sakata und Setoyama 1997).

5.1.4. Weitere studienspezifische Überlegungen zum tierexperimentellen Teil der Studie

Für die vorliegende Studie wurde die Zahl der gesäugten Ferkel pro Sau am ersten Tag post partum auf zwölf standardisiert. Die Sauen in dieser Studie hatten 14-16 Zitzen und hätten die Kapazität gehabt, mehr als zwölf Ferkel aufzuziehen. Es ist deshalb unklar, ob eine Gruppe an Ferkeln durch die reduzierte Wurfgröße und die verminderte Konkurrenz profitiert hat. Generell hängt die Milchleistung von Sauen von der Anzahl der funktionsfähigen Gesäugekomplexe ab, welche wiederum abhängig von der Anzahl der zu säugenden Ferkel ist (Auld et al. 1998). In der Studie von Auld et al. (1998) wurden nur unwesentliche numerische Unterschiede im durchschnittlichen Wachstum der Ferkel festgestellt, wenn die Wurfgröße zwölf oder 14 Ferkel betrug. Jedoch zeigen Studien mit hochproliferativen Sauen, dass, wenn die Anzahl der Ferkel die Anzahl der funktionsfähigen Gesäugekomplexe übersteigt, Ferkel aus Würfen mit 14 Ferkeln höhere Absetzgewichte hatten als Ferkel aus Würfen mit 17 Ferkeln pro Wurf (Kobek-Kjeldager et al. 2020b). Gleichzeitig zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass Ferkel mit einem niedrigen BW häufiger Zeichen von Rankämpfen (u. a. Bisswunden an den Schnauzen) aufwiesen als Ferkel mit höherem BW und somit von einer höheren Konkurrenz innerhalb eines Wurfs negativ beeinflusst waren (Kobek-Kjeldager et al. 2020a). Es besteht also die Möglichkeit, dass durch die reduzierte Wurfgröße LBW Ferkel profitiert haben könnten.

Weiterhin kann das Management zur Induktion der Geburt nach heutigem Kenntnisstand hinterfragt werden. In dieser Studie wurde die Geburt der Ferkel durch die Injektion eines Prostaglandin-Analogons am Tag 114 der Trächtigkeit und einer Injektion eines langwirksamen Oxytocin-Präparates am 115. Tag der Trächtigkeit eingeleitet (Rehfeldt et al. 2011). Der routinemäßige Einsatz von lang und kurz wirkenden Oxytocin-Präparaten zur Geburtseinleitung wird nach heutigem Kenntnisstand zunehmend kritisch betrachtet (Muro et al. 2021; Hill et al. 2022). Der Einsatz von lang wirkenden Oxytocin-Präparaten beschleunigt zwar den Geburtsvorgang, jedoch zum Preis von mehr totgeborenen Ferkeln sowie Ferkeln, die weniger vital sind (Muro et al. 2021). Die relative Anzahl der totgeborenen Ferkel betrug in dieser Studie 3,23 % und war somit relativ hoch (Große Beilage und Wendt 2013). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass nur mit einer Schwimmprobe der Lunge nachgewiesen werden kann, ob ein Ferkel tot oder sehr lebensschwach geboren wurde (Hales et al. 2013). Eine entsprechend genaue Differenzierung wurde in der eigenen Studie nicht durchgeführt. Es bleibt letztendlich ungewiss, inwiefern die gewählte Praxis Auswirkungen auf die selektierten Ferkel und ihr Überleben sowie deren Entwicklung hatte.

5.1.5. Methodische Problematiken bei der Quantifizierung von Tight Junction-Proteinen

Trotz intensiver Bemühungen war es nicht möglich, TJP mittels Western-Blot verlässlich zu quantifizieren. Auch wenn in anderen Studien bereits porcine TJP mittels Western-Blot quantifiziert wurden, waren die dort verwendeten Protokolle nicht zu reproduzieren. Zudem wiesen zahlreiche Studien Mängel bei der Darstellung der Ergebnisse des Western-Blots auf: Unvollständige Beschreibung der Versuchsdurchführung, lückenhafte Dokumentation der Versuchsergebnisse und Abweichungen in den Ergebnissen der semiquantitativen Analyse zwischen verschiedenen kommerziell erhältlichen Antikörpern (Gilda et al. 2015). Dies wirft Fragen an der Qualität der durchgeführten Western-Blots auf und somit an der Aussagekraft der veröffentlichten Arbeiten. Außerdem wird durch die nicht standardisierte Dokumentation die Reproduzierbarkeit der Arbeiten und der Methode in Frage gestellt.

Generell kann die Abundanz von TJP auf mRNA- und Proteinebene sowie die Lokalisation der TJP potentielle Mechanismen für eine mögliche erhöhte Permeabilität liefern. Jedoch bleibt es spekulativ, ob eine erhöhte Permeabilität tatsächlich auch vorliegt (Vancamelbeke und Vermeire 2017), da entsprechende Messungen Permeabilitätsmessungen (z.B. *in vivo* Lactulose-Mannitol-Test, *ex vivo* Ussing-Kammer) nicht durchgeführt wurden.

5.2. Effekte einer neonatalen Gln-Supplementierung auf Wachstum und ausgewählte jejunale Entwicklungsparameter

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Gln-Supplementierung während der frühen neonatalen Phase das Wachstum von LBW-Ferkeln sowohl in der akuten als auch in der persistenten Phase der Studie verbesserte. Jedoch war das verbesserte Wachstum nicht offensichtlich auf eine verbesserte Entwicklung des Jejunums zurückzuführen. Insgesamt waren Effekte einer Gln-Supplementierung auf zahlreiche jejunale Parameter wie die Abundanz von TJP-mRNA, die FPSR und die Konzentration von Gln in jejunalen Digesta nicht nachweisbar. Auf Grund der fehlenden Erhöhung der Gln-Konzentration bzw. der Ala-Konzentration in den jejunalen Digesta stellt sich die Frage, in welchem Bereich des Dünndarms, zu welchem Zeitpunkt die beiden supplementierten AS absorbiert und in welchem Umfang diese metabolisiert wurden. Untersuchungen aus einem Vorversuch zeigen, dass die maximale Gln-Konzentrationen (1,06 mmol/l) im Plasma 45 Minuten nach der Supplementierung (0,33 g/kg BW) erreicht werden und nach ca. 240 Minuten wieder das Ausgangsniveau (613 µmol/l) erreichen (Li et al. 2022). Somit besteht die Möglichkeit, dass Gln in einem weiter kranial gelegenen Abschnitt des Dünndarms absorbiert wurde und dort

möglicherweise die Entwicklung des Dünndarms beeinflusst hat. Die Absorptionskinetik von Gln und anderen AS, welche als kristalline AS supplementiert wurden, sind bisher noch nicht untersucht worden. Jedoch wurde gezeigt, dass kristalline AS schneller absorbiert werden als proteingebundene AS ohne den Ort der Absorption genauer zu spezifizieren (Yen et al. 2004). In *in-vitro*-Untersuchungen von porcinen Epithelzellen wurden die deutlichsten Effekte auf Zellproliferationsrate und TJP-Abundanz von Gln bei einer Konzentration von 2 mmol/l beobachtet (Xi et al. 2012; Wang et al. 2015a; Yi et al. 2015) Die Ergebnisse einer Partnerstudie (Li et al. 2022) zeigten, dass die gewählte Supplementierung die Konzentration von Gln im Plasma erhöhte, jedoch nicht die Konzentration von 2 mmol/l erreichte. In den entsprechenden Digestaproben des Jejunums wurden auch nur Gln-Konzentrationen von 3,33 $\mu\text{mol/g}$ (Frischmasse) gemessen. Es ist fraglich, ob in einem Tiermodell diese Konzentrationen über einen längeren Zeitraum aufrecht gehalten werden können und vergleichbare Effekte wie in der Zellkultur zu beobachten sind. Gleichzeitig scheint der Spielraum für die Dosis einer Gln-Supplementierung bei Saugferkeln gering zu sein. Haynes et al. (2009) berichten positive Effekte von Gln auf das Wachstum von Saugferkeln, wenn diese täglich zweimal mit 3,42 mmol/kg BW Gln (0,5 g/kg BW Gln) supplementiert wurden. Dies entspricht einer täglichen Dosis von 1 g/kg BW Gln pro Tag. Bei einer zweimal täglichen Supplementierung von 6,84 mmol/kg BW Gln (1 g/kg BW Gln) wurden negative Effekte auf das Wachstum von Ferkeln festgestellt. Bei einer täglichen Supplementierung von 1,52 g/kg BW Gln wurde zwischen dem siebten und dem 21. Lebenstag kein verbessertes Wachstum der Saugferkel nachgewiesen (He et al. 2019). Diese Daten legen nahe, dass eine positive Wirkung einer oralen Gln-Supplementierung nur in einem kleinen Dosispektrum wirksam ist. Die bisherige in Studien verwendete tägliche Dosis für Saugferkel betrug 1 g/kg BW, welche auf zwei oder drei Portionen pro Tag verteilt wurden. Gleichzeitig besteht auch immer die Gefahr, dass die Supplementierung einzelner AS zu Imbalancen in der AS-Versorgung führt, wie dies in den Studien von Getty et al. (2015) und Haynes et al. (2009) aufgezeigt wurde. Diese Imbalancen äußerten sich durch ein verlangsamtes Wachstum der Saugferkel. In der durchgeführten Studie wurden keine negativen Effekte der Gln-Supplementierung auf das Wachstum der Tiere im Vergleich zu den Ala-supplementierten Tieren festgestellt. Die gewählte Supplementierungstechnik ist für die durchgeführte Grundlagenforschung sinnvoll, jedoch unter Praxisbedingungen nur schwierig zu realisieren. Die gewählte tierindividuelle orale Supplementierung hat den Vorteil, dass jedes Tier exakt supplementiert wird, jedoch ist diese Prozedur mit großem Arbeitsaufwand verbunden. Allerdings bleibt die Frage offen, welche Fütterungsmethode zur Supplementierung von Gln bei Saugferkeln effizient, exakt und ökonomisch umsetzbar ist. Diese Frage wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.1. Alternative Supplementierungsstrategien

Es ist fraglich, ob Gln-supplementiertes Beifutter eine adäquate Möglichkeit zur Supplementierung ist, da Studien, welche die Effekte eines Gln-supplementierten Beifutters untersuchten, kein eindeutiges Ergebnis bezüglich des Wachstums von Ferkeln während der Säugephase erzielten und die Beifutteraufnahme nicht tierindividuell, sondern nur auf Wurfebene bestimmt wurde (Cabrera et al. 2013; Hanczakowska 2014). Somit ist es nicht gewährleistet, dass jedes Saugferkel das Beifutter in ausreichender Menge aufnimmt (Huting et al. 2021), da die Aufnahme von Beifutter durch zahlreiche Faktoren (u. a. Verfügbarkeit von Milch, Alter der Ferkel, Beschaffenheit des Beifutters, Geburtsgewicht der Ferkel) beeinflusst wird. Insgesamt ist die Aufnahme von Beifutter in der Säugephase tierindividuell sehr variabel und hängt auch von der Beschaffenheit des Beifutters ab (Huting et al. 2021). Somit ist nicht sicher, ob die kalkulierten Gln-Mengen überhaupt aufgenommen werden.

Eine andere Möglichkeit, die Aufnahme von Gln zu erhöhen, ist die Supplementierung der Muttersauen. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine maternale Supplementierung die Konzentration von freiem Gln in der Milch erhöht. Die Gln-Konzentration war dabei um den Faktor 1,5-2,5 höher im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kitt 2004; Manso et al. 2012; Yang et al. 2018). In den erwähnten Studien wurde das quantitativ wichtigere proteingebundene Gln nicht bestimmt. Die Effekte einer maternalen Gln-Supplementierung auf das Wachstum und die Parameter der intestinalen Entwicklung der Saugferkel unterschieden sich dabei zwischen den genannten Studien, da sowohl positive (Manso et al. 2012; Yang et al. 2018) als auch keine Effekte beobachtet wurden (Kitt 2004; Wessels et al. 2023). Im Allgemeinen ist es mehr als fraglich, ob die quantitativ bedeutsamere Menge des proteingebundenen Gln in der Milch über eine Supplementierung von Gln beeinflusst werden kann, da die Aminosäuresequenz des porcinen Caseins im Genom des Schweines festgeschrieben ist (Gallagher et al. 1997). In der porcinen Milch liegen die Konzentrationen an proteingebundenem Gln zwischen 3,75 und 10,8 g/l. Die Konzentrationen an freiem Gln liegen zwischen 0,015 und 0,532 g/l. Somit ist die Konzentration an proteingebundenem Gln abhängig vom Laktationstag zwischen dem Faktor sieben bis 100 höher im Vergleich zur Konzentration an freiem Gln (Haynes et al. 2009).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, Milchaustauscher mit Gln zu supplementieren. Glutamin, welches in humanen parenteralen Ernährungslösungen enthalten ist, degradiert bei 20-22 °C mit 0,9 %/Tag (Khan und Elia 1991). Die Verwendung eines Gln-Dipeptids könnte aber diese Degradierung umgehen, da Gln-Dipeptide wie Glycyl-L-Gln oder Alanyl-L-Gln deutlich stabiler in wässrigen Lösungen sind (Arii et al. 1999). Untersuchungen zur Stabilität von Gln in Milchaustauschern sind bisher nach dem Wissen des Autors dieser Arbeit nicht publiziert. Bei einer mehrmals täglichen, frischen Zubereitung des Milchaustauschers, welches aus

hygienischen Gründen angebracht ist (Baumann et al. 2012), dürfte die Degradierung des Gln jedoch vernachlässigbar sein. Da die Akzeptanz des Milchaustauschers innerhalb eines Wurfes tierindividuell variabel ist und der Konsum des Milchaustauschers mit dem Alter zunimmt, ergeben sich durch die Supplementierung eines Milchaustauschers ähnliche Probleme, wie beim Angebot von Gln-supplementiertem Beifutter (Huting et al. 2021). Da der Milchaustauscher besonders von Ferkeln mit LBW angenommen wird (Douglas et al. 2014), könnte ein Gln-supplementierter Milchaustauscher eine potentielle Intervention zur Verbesserung des Wachstums von LBW-Ferkeln sein. Mit dem Einbau eines solchen Automaten sind entsprechende Kosten verbunden und es entsteht zusätzlicher Arbeitsaufwand bei Reinigung und Wartung, wobei Untersuchungen zur Wirtschaftlichkeit solcher Tränkautomaten bisher nicht publiziert sind. Zudem liegen keine Untersuchungen vor, ob durch einen mit Gln angereicherten Milchaustauscher das Wachstum oder Parameter der Darmentwicklung positiv beeinflusst werden.

Diese Arbeit zeigt auch, dass eine Gln-Supplementierung nur einen geringgradigen Einfluss auf Parameter der jejunalen Entwicklung hat. Für zukünftige Studien wäre es auch interessant, die Effekte einer Gln-Supplementierung auf Wurfebene zu betrachten und zu klären, ob die von Wu et al. (2011) beobachteten Effekte von Gln auf das Überleben der Ferkel zu reproduzieren sind. Hierfür ist zu klären, inwiefern Parameter der jejunalen Entwicklung durch LBW oder IUGR gestört sind und wie sich diese Störung auf die Entwicklung des gesamten Organismus auswirkt. Diese Frage wird im folgenden Kapitel diskutiert.

5.3. Effekte des niedrigen Geburtsgewichtes auf Wachstum und ausgewählte jejunale Entwicklungsparameter

Generell ist es fraglich, ob Ferkel mit niedrigem Geburtsgewicht das gleiche BW wie NBW-Ferkel während der Säugephase erreichen können, wenn NBW-Ferkel nicht in ihrem Wachstum eingeschränkt sind (Huting et al. 2018). Für die Zunahme von einem Gramm BW werden etwa 4 Gramm Milch benötigt (Hojgaard et al. 2020). Die Körpergewichtszunahmen beruhen vor allem auf einer Zunahme der Proteinmenge und der Einlagerung von Wasser, da ein Gramm Protein die Speicherung von 4,2 Gramm Wasser ermöglicht (Hojgaard et al. 2020). Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass die Proteinmenge in der Milch der limitierende Faktor für das Wachstum von Ferkeln ist (Harrell et al. 1993;Hojgaard et al. 2020). Unter der Voraussetzung, dass Ferkel mit niedrigem Geburtsgewicht Milch genauso effizient nutzen wie Ferkel mit durchschnittlichem Geburtsgewicht, ergibt sich für diese Arbeit nach der Kalkulation von Hojgaard et al. (2020), bei einer durchschnittlichen Geburtsgewichtsdifferenz von 450 g zwischen LBW und NBW-Ferkeln, eine notwendige Milchaufnahmemenge von 1890 g. Diese

Milchmenge müsste rein rechnerisch von den LBW-Ferkeln aufgenommen werden, um die Gewichts Differenz, die seit der Geburt besteht, auszugleichen. In Anbetracht des geringeren Magenvolumens von Ferkeln mit IUGR gegenüber NBW-Ferkeln (Lynegaard et al. 2020), wird deutlich, dass ein „Aufholen“ von Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht unter konventionellen Bedingungen während der Säugephase fast unmöglich ist. Die Effekte eines niedrigen Geburtsgewichtes auf den Parameter FPSR in der Skelettmuskulatur wurden beim Schwein noch nicht untersucht, jedoch argumentieren Posey und Davis (2023), dass zu früh geborene Ferkel eine geringere FPSR in der Skelettmuskulatur aufweisen und übertragen diese Beobachtung auch auf LBW-Ferkel (Posey und Davis 2023). Diese Arbeit und andere zeigen, dass die Differenz für den Parameter BW während der Säugephase größer wird (Getty et al. 2015; Huygelen et al. 2015; Wang et al. 2016c). Es wurde bereits nachgewiesen, dass durch eine intensivierete Fütterung IUGR-Ferkel gleiche Tageszunahmen in der frühen neonatalen Phase wie NBW-Ferkel, die eine Kontrolldiät erhielten, erreichen können (Han et al. 2013). Jedoch blieb das BW der IUGR-Ferkel auch unter einer intensiveren Fütterung geringer als das BW der NBW-Kontrolltiere. Es ist auffällig, dass Unterschiede im BW zwischen Tieren mit LBW oder IUGR und Tieren mit NBW zwar auftreten; aber Unterschiede im BW nicht zwangsweise mit veränderten intestinalen Parametern, wie z. B. der Morphologie, der Abundanz von TJP, einer vermehrten Immigration von Immunzellen oder sonstigen Zeichen einer Entzündung, während der Säugephase und darüber hinaus verbunden sind (Huygelen et al. 2015; Everaert et al. 2017). Auch in dieser Arbeit sind in beiden Behandlungsgruppen Unterschiede im BW zwischen Ferkeln mit NBW und LBW präsent. Jedoch fanden sich kaum Hinweise darauf, dass sich die Ferkel hinsichtlich der gewählten intestinalen Parameter unterscheiden. Weiterhin gab es keine Anzeichen dafür, dass Ferkel mit LBW vermehrt unter oxidativem Stress leiden. Die Annahme, dass die intestinale Entwicklung von LBW-Ferkeln gestört ist, lässt sich auf Grund der durchgeführten Messungen und verschiedener vergleichbarer Arbeiten nicht bestätigen (Huygelen et al. 2015; Everaert et al. 2017). Jedoch existiert aus einer epidemiologischen Untersuchung die Beobachtung, dass ein geringes Geburtsgewicht geringfügig für neonatale Diarrhoe prädisponiert (Kongsted et al. 2014). Diese Disposition könnte sich wiederum aber auch durch eine geringere Kolostrumaufnahme von LBW-Ferkeln erklären (Hales et al. 2013) und nicht durch eine unvollständige intestinale Reifung bedingt sein.

Die Gründe für die fehlenden Effekte des niedrigen Geburtsgewichtes auf die Parameter der jejunalen Entwicklung sind zahlreich und umfassen unter anderem: Fütterung, Alter, untersuchter Abschnitt des Jejunums und Genetik (Everaert et al. 2017). Weitere methodische Probleme ergeben sich beim Vergleich verschiedener Studien, die sich auf Ferkel mit LBW konzentrieren. Dieser Sachverhalt wurde bereits in einem vorherigen Kapitel diskutiert (Kapitel 5.1.1 und 5.1.2). Generell ist nicht eindeutig geklärt, ob und unter welchen Umständen LBW

die Permeabilität des porcinen Dünndarms, die antioxidative Abwehr, den Aminosäurenstoffwechsel und die Morphologie des Dünndarms beeinflusst (Huygelen et al. 2014a; Huygelen et al. 2014b; Wang et al. 2016c).

5.4. Alterseffekte auf ausgewählte Entwicklungsparameter des Jejunums

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist, die Effekte einer neonatalen Gln-Supplementierung auf das Wachstum und die jejunale Entwicklung von Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht zu untersuchen. Wie in den vorherigen Kapiteln (vergleiche Kapitel 3 und 4) dargestellt, hat Gln das Wachstum von Ferkeln mit niedrigem Geburtsgewicht in der akuten Phase und darüber hinaus verbessert. Jedoch blieben die Effekte einer Gln-Supplementierung und des Geburtsgewichts auf die ausgewählten intestinalen Parameter gering. Um die Entwicklung des Jejunums während der neonatalen Phase besser zu verstehen, wurden zusätzlich die drei experimentellen Altersgruppen (5-Tage, 12-Tage und 26-Tage $n=48$) miteinander verglichen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sich die Ferkel mit niedrigem Geburtsgewicht im Hinblick auf die gemessenen intestinalen Parameter ähnlich entwickelten, obwohl die LBW-Ferkel leichter blieben als ihre NBW-Geschwister.

Der Vergleich zwischen den Altersgruppen zeigt, dass das Alter der Tiere, und somit u. a. ontogenetische Faktoren, entscheidend bei der intestinalen Entwicklung waren. Wie zu erwarten, zeigten die Ferkel im Alter von 26 Tagen das höchste BW. Auch auf histologischer Ebene zeigte sich, dass in Hinblick auf die Morphologie deutliche Unterschiede auftreten. Dabei entsprach das Längenwachstum der Zotten und die Entwicklung der Krypten sowie die gesamte Entwicklung der Morphologie dem gleichen Entwicklungsschema, wie von Al Masri et al. (2015) in einer Übersichtsarbeit beschrieben. Außerdem wurden im Gewebe des Jejunums der Tag 26-Gruppe mehr intraepitheliale Lymphozyten und Ig-A positive Zellen nachgewiesen als in Tieren der beiden jüngeren Altersgruppen. Eine Zunahme der intraepithelialen Lymphozyten wurde im Zeitraum der Säugephase bereits beschrieben und könnte mit der zusätzlichen Beifutteraufnahme und einer veränderten mikrobiellen Population zu erklären sein, wobei die lokale bakterielle Population einen stimulierenden Effekt auf die intraepithelialen Lymphozyten haben könnte (Rothkötter et al. 1991; Rothkötter et al. 1999). Weiterhin hat sich auch die Population der Becherzellen vom fünften Lebenstag zum 26. Lebenstag im Jejunum verändert. In diesen Zeitraum hat die Gesamtpopulation an Becherzellen im Jejunum zugenommen. Die Funktion von Becherzellen ist die Sezernierung von Mucus, welcher zur Erhaltung der intestinalen Barriere beiträgt (Everaert et al. 2017). In einer früheren Untersuchung wurde eine Korrelation zwischen der Anzahl an Becherzellen im

Gewebe des Jejunums und der Besiedlung mit *Leptotrichiceae* nachgewiesen (Arnaud et al. 2020). Dies stützt die Annahme, dass das Mikrobiom einen Einfluss auf die intestinale Entwicklung haben könnte. In einer Partnerstudie, welche die Effekte einer Gln-Supplementierung, eines niedrigen Geburtsgewichtes und des Alters auf die Entwicklung des Colons in den zuvor untersuchten Tieren erforschte, ergab, dass sich das Mikrobiom im Colon vom fünften zum zwölften Lebensstag ändert (u. a. Zunahme der Abundanz des Phylus *Spirochaetae*) (Schulze Holthausen et al. 2022). Die veränderte mikrobielle Population war mit veränderten Konzentrationen biogener Amine im Colon-Chymus und einer Zunahme intraepithelialer Lymphozyten und Ig-A positiver Zellen in der Colon-Schleimhaut assoziiert (Schulze Holthausen et al. 2022). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Mikrobiom auch bei der Entwicklung des GIT bei den Tieren dieser Studie einen entscheidenden Einfluss haben könnte.

Auch die Quantifizierung der Bromdesoxyuridin-Inkorporation (**BrdU**) zur Bestimmung der Zellproliferationsrate ergab, dass die Ferkel der 26-Tage-Gruppe die höchste Rate der Zellproliferation im Jejunum zeigten. In der Studie einer anderen Arbeitsgruppe wurde im Verlauf der Säugephase die Menge des Zellproliferationsmarkers PCNA im Jejunum bestimmt und ebenfalls bei Ferkeln, die kurz vor dem Absetzen standen, die höchste Menge dieses Markers nachgewiesen (Huygelen et al. 2014a). Ebenfalls wurde im Jejunum von 21 Tage alten Saugferkeln ein höherer Prozentsatz an PCNA positiven Zellen ermittelt, im Vergleich zu sieben und 14 Tage alten Saugferkeln (Wang et al. 2016b). Zum gleichen Zeitpunkt beobachtete die Arbeitsgruppe um Huygelen et al. (2014a) auch, dass die Kryptentiefe am größten war. Dies ist auch das Ergebnis unserer histologischen Untersuchung. Unsere Ergebnisse und die Ergebnisse anderer Autoren (Huygelen et al. 2014a, Wang et al. 2016b) zeigen, dass zum Ende der Säugephase die Zellproliferation am größten ist. Der Umstand, dass die Zellproliferation mit dem Alter der Ferkel zunimmt, ist seit Jahrzehnten bekannt und wird unter anderem mit unterschiedlichem klinischen Verlauf viraler Enteriden in Verbindung gebracht (Jung et al. 2015).

Den Ausgangspunkt der Zellproliferation von Enterozyten bilden intestinale epitheliale Stammzellen, die in den Krypten des Jejunums lokalisiert sind (Gonzalez et al. 2013). Jedoch wurden auch BrdU-positive Zellen in allen Altersgruppen in den Villi des Jejunums nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde zuvor bereits beschrieben. Bei diesen BrdU-positiven Zellen könnte es sich um Zellen lymphatischen Ursprunges handeln, wobei es unklar ist ob diese Zellen lokal proliferieren oder in die Mukosa immigrieren (Rothkötter et al. 1999). Grundsätzlich ermöglicht der BrdU-Essay nur eine Identifikation proliferierender Zellen, wobei es nicht möglich ist, diese Zellen weiter zu differenzieren.

Es gestaltet sich als schwierig, die Unterschiede in Bezug auf die intestinalen Parameter alleinig auf das Alter der Tiere oder die zusätzliche Beifutteraufnahme zurückzuführen. Sowohl in unserem Versuch als auch in der Studie von Huygelen et al. (2014a) hatte die älteste Studiengruppe Zugang zu Beifutter. Hingegen wurden die Ferkel in der Arbeit von Wang et al. (2016b) ausschließlich von der Muttersau gesäugt. Die Effekte von Beifutter auf die Entwicklung des GIT sind wegen einer variablen Aufnahme des Beifutters nur schwierig abzumessen (Pluske et al. 2018), wobei positive Effekte einer Beifutteraufnahme auf die Morphologie nicht immer nachgewiesen werden (Muns und Magowan 2018).

Zwischen den Altersgruppen ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Abundanz von TJP. Studien, welche die Abundanz von Occludin-mRNA im Jejunum im Verlauf der Säugephase untersuchten, berichten über einen Anstieg (Wang et al. 2016b) oder eine stabile Expression von Occludin (Wang et al. 2016c). Studien über die Expression von ZO-1 während der Säugephase im Jejunum zeigen, dass die Expression am siebten und 21. Lebenstag nicht unterschiedlich ist. Jedoch war die Expression am 14. Lebenstag geringer als am 21. Lebenstag (Wang et al. 2016b). Im Unterschied zu beiden zuvor genannten Studien wurden andere Normalisierungsverfahren und nur jejunale Mucosa verwendet.

Die Lokalisation der TJP wurde durch IHC bestimmt. Zwischen den untersuchten Altersgruppen traten keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation auf. In der Literatur wurde für neonatale Saugferkel beschrieben, dass Claudin-4 seine Lokalisation in den ersten Lebenstagen ändert und die Änderung der Lokalisation mit der Fähigkeit zur Absorption von Makromolekülen assoziiert ist (Ewaschuk et al. 2011). Es scheint, dass dieser Prozess bei fünf Tage alten Ferkeln bereits abgeschlossen ist.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die Konzentration verschiedener AS in freier und in proteingebundener Form im Jejunum zwischen dem fünften und dem zwölften Lebenstag ändert. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass im gleichen Zeitraum die Konzentration an Proteinen signifikant abnimmt. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Konzentration verschiedener Aminometaboliten sowie die mRNA-Abundanz von Zielgenen, die in Verbindung mit dem Aminosäurenstoffwechsel stehen, im Gewebe des Jejunums zwischen dem fünften und zwölften Lebenstag unterschiedlich ist. Während der neonatalen Entwicklung verändern sich der Protein- und Aminosäurenstoffwechsel im Jejunum (Darcy-Vrillon et al. 1994; Wang et al. 2018a), welches durch Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wird. Auch wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die mRNA-Abundanz von ausgewählten Aminosäuretransportern im Jejunum von Ferkeln altersabhängig reguliert wird. Frühere Studien konnten zeigen, dass die AS-Absorption pro Längeneinheit des Dünndarms mit zunehmendem Alter abnimmt, wobei diese Abnahme der Absorptionsleistung durch ein Längenwachstum des Dünndarms kompensiert wird und die Fähigkeit zur Absorption von AS

sogar ansteigt, um die mit dem Alter steigenden Mengen an aufgenommenen AS zu absorbieren (Buddington et al. 2001). Abschließend bleibt festzuhalten, dass Alterseffekte die deutlichsten Auswirkungen auf die Parameter der jejunalen Entwicklung hatten, im Vergleich zu den Parametern Geburtsgewicht und Gln-Supplementierung.

5.5. Potentielle weitere Forschungsfragen

Um die genauen Mechanismen einer oralen Gln-Supplementierung bei Saugferkeln zu verstehen, muss noch weitere Forschung erfolgen. Gleichzeitig darf bei dieser Forschung die Praktikabilität der Supplementierung nicht in den Hintergrund geraten. Grundsätzlich sollten in zukünftigen Studien weiter kranial gelegene Darmabschnitte untersucht werden. In verschiedenen Infektionsmodellen und bei Ferkeln, welche durch das Absetzen von der Sau gestresst wurden, wurden die deutlichsten Effekte von Gln berichtet. Infektionsmodelle, die spezifisch für Saugferkel sind, wurden bisher nicht untersucht. Das porcine epidemische Diarrhoe Virus, ein Coronavirus, hat in der Vergangenheit zu eklatanten Ferkelverlusten geführt (Jung et al. 2015) und könnte als ein Test des Immunsystems für zukünftige Supplementierungsstudien dienen, um zu klären, ob eine Gln-Supplementierung bei Ferkeln unter Infektionsstress positive Wirkungen besitzt. Hinsichtlich der Methodik sind für zukünftige Studien weitere Fragestellungen offen. Es bleibt unklar, inwiefern die als Kontrolle supplementierte Ala negative bzw. positive Effekte auf die Entwicklung von Saugferkeln hat und ob sich entsprechende Ergebnisse auch gegenüber einer Kontrollgruppe reproduzieren lassen, welche mit einer isonitrogenen Menge von hochverdaulichem Casein, Molkenprotein oder eines Aminosäurengemisches supplementiert wurden. Auch sollten zukünftige Studien Messungen zur Funktionsfähigkeit der Darmbarriere durchführen, um die Frage zu beantworten, ob eine Gln-Supplementierung oder LBW die Darm-Permeabilität beeinflussen, die evtl. durch etablierte molekularbiologische Methoden zu erklären sind. Gleichzeitig muss auch die Rolle des Mikrobioms im Dünndarm bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Letztendlich müssen weitere Fragen zur praxistauglichen Anwendung geklärt werden. Erstens: Wie stabil ist Gln in Milchaustauschern. Zweitens: Verbessern mit Gln angereicherte Milchaustauscher das Wachstum von Ferkeln und sind diese Verfahren praxisnah umsetzbar. Nur so kann auch geklärt werden, ob Gln die Gesundheit von Saugferkeln und somit auch das Tierwohl dieser Tiere fördert.

6. Fazit

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Entwicklung des Jejunums nur in geringem Umfang von der Gln-Supplementierung und vom Geburtsgewicht beeinflusst wurde. Das Alter, in dem die Ferkel beprobt wurden, hat demnach eine viel entscheidendere Rolle auf die Entwicklung des Jejunums. Das genaue Zusammenspiel der Faktoren Epigenetik, mikrobielle Besiedlung und Beifutteraufnahme bleibt jedoch unklar und ist somit ein möglicher Schwerpunkt zukünftiger Forschung.

7. Zusammenfassung

Effekte einer neonatalen Glutamin-Supplementierung auf Wachstum, mRNA-Abundanz ausgewählter Tight Junction-Proteine und den Aminosäurenstoffwechsel bei Saugferkeln mit niedrigem und normalem Geburtsgewicht

In den letzten Jahrzehnten ist durch gezielte Zucht die Wurfgröße bei Sauen gestiegen und mit dieser Entwicklung hat die Anzahl der Ferkel pro Wurf mit niedrigem Geburtsgewicht (LBW) zugenommen. Höhere Mortalitäts- und geringere Wachstumsraten werden bei LBW-Ferkeln beobachtet. Die hohen Mortalitätsraten werfen Fragen zur ethischen Rechtfertigung der Schweinehaltung auf und stehen im Kontrast zu einer ressourceneffizienten Tierhaltung. Die geringeren Wachstumsraten sind mit ökonomischen Verlusten verbunden und werden mit einer dysfunktionalen Dünndarmentwicklung von LBW-Ferkeln assoziiert. Bei abgesetzten Ferkeln wurden positive Effekte einer Glutamin (Gln)-Supplementierung auf Wachstum und Parameter der intestinalen Entwicklung beschrieben. Da die konditionell essentielle Aminosäure Gln zu einem großen Umfang in den Epithelzellen des Dünndarms verstoffwechselt wird, besteht die Möglichkeit, dass durch Gln die Entwicklung des Dünndarms bei LBW-Ferkeln normalisiert werden könnte.

Ziel dieser Studie war es sowohl die akuten als auch potentielle persistente Effekte einer neonatalen Gln-Supplementierung bei männlichen unkastrierten Ferkeln auf Wachstum und verschiedener Parameter der jejunalen Entwicklung zu untersuchen.

Hierfür wurden männlich unkastrierte Saugferkel in einem Fütterungsversuch untersucht. Die Ferkel von Jungsaugen wurden direkt nach der Geburt auf Grund ihres Geburtsgewichtes in Paaren selektiert, wobei die Selektionsgrenzen für LBW bei 0,8-1,2 kg und für normalgewichtige Ferkel (NBW) bei 1,4-1,8 kg lagen. Selektierte Ferkel wurden entweder mit 1 g/kg Körpergewicht (BW) Gln oder der isonitrogenen Menge Alanin (Ala) (1,22 g/kg BW) zwischen dem ersten und dem zwölften Lebenstag oral supplementiert. Durch den Versuchsaufbau ergaben sich vier Versuchsgruppen (LBW-Gln; NBW-Gln; LBW-Ala; NBW-Ala ($n=36$ /Versuchsgruppe)). Die Versuchstiere hatten stets die Möglichkeit, bei der Muttersau zu saugen und erhielten zusätzliches Beifutter ab dem 14. Lebenstag. Das Wachstum der Tiere wurde durch regelmäßiges Wiegen und zusätzliche zootecnische Messungen überwacht. Jeweils ein Drittel einer Versuchsgruppe wurde am fünften, zwölften sowie sechsundzwanzigsten ($n=12$) Lebenstag euthanasiert und das distale Jejunum inklusive Chymus wurde für weitere Analysen beprobt. Den Tieren aller Versuchsgruppen wurde eine Stunde vor der Euthanasie Bromdesoxyuridin (BrdU) zur Bestimmung der Zellproliferationsrate und L-²H₅-Phenylalanin zur Bestimmung der fraktionellen

Proteinsyntheserate (FPSR) intraperitoneal verabreicht. Zusätzlich wurde die Milchaufnahme mittels der Deuteriumoxid-Methode am elften bzw. am fünfundzwanzigsten. Lebenstag in entsprechenden Gruppen bestimmt.

Die ausgewerteten Parameter der jejunalen Entwicklung wurden sowohl durch die Gln-Supplementierung als auch durch das niedrige Geburtsgewicht nur geringfügig beeinflusst. Interessanterweise unterschied sich die Konzentration der supplementierten Aminosäuren im beprobten Jejunum-Gewebe und im Chymus zwischen den Supplementierungsgruppen nicht. Entsprechend wurden keine Unterschiede im Gewebe des Jejunums im Hinblick auf Morphologie, Immunzellpopulation und FPSR festgestellt. Weiterhin wurde kein Einfluss von Gln auf mRNA-Abundanz von Genen, welche den Aminosäuretransport, Aminosäurenstoffwechsel und Glutathion-Stoffwechsel regulieren, festgestellt. Für entsprechende Parameter wurden nur geringe Unterschiede zwischen den Geburtsgewichtgruppen beobachtet. Das Alter der Ferkel hatte den stärksten Einfluss auf die Parameter der jejunalen Entwicklung. Folglich wurden Unterschiede in Bezug auf Morphologie, Aminosäuremuster, Zellpopulation, Nukleinsäure-Konzentration und mRNA-Abundanz von Genen des Glutathionmetabolismus zwischen den zwölf und fünf Tage alten Ferkeln festgestellt.

Das BW von LBW-Gln-Ferkeln war sowohl während der akuten Supplementierung als auch darüber hinaus höher als bei LBW-Ala-Ferkeln. Jedoch war das BW am 26. Lebenstag zwischen LBW-Gln-Ferkeln und LBW-Ala-Ferkeln nicht unterschiedlich. Das höhere BW der LBW-Gln-Ferkel kann mit einer vergrößerten jejunalen Absorptionsfläche assoziiert werden. Das Wachstum von NBW und folglich das BW waren höher im Vergleich zu LBW. Das schnellere Wachstum beruht dabei nicht auf Unterschieden der intestinalen Entwicklungsparameter, da negative Effekte von einem niedrigen Geburtsgewicht auf die Darmentwicklung aus den gemessenen jejunalen Entwicklungsparametern nicht abzuleiten sind. Es wurden in Bezug auf jejunale Entwicklungsparameter, wie Zellproliferationsrate, Zellpopulation und Morphologie, Unterschiede zwischen den zwölf und 26 Tage alten Ferkeln festgestellt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine orale Gln-Supplementierung das Wachstum von LBW-Ferkeln nur kurzfristig verbesserte, jedoch nur in sehr geringem Umfang Parameter der jejunalen Entwicklung beeinflusste. Außerdem wurde festgestellt, dass LBW nicht mit einer Entwicklungsstörung des Jejunums assoziiert ist und folglich nicht für das verlangsamte Wachstum verantwortlich ist. Schließlich wurde aufgezeigt, dass besonders ontogenetische Faktoren die Parameter der jejunalen Entwicklung beeinflussen.

8. Summary

Effects of a neonatal glutamine supplementation on growth mRNA abundance of selected tight junction proteins and amino acid metabolism in low and normal birthweight piglets

Continuous breeding for highly prolific sows has resulted in an increase in the number of piglets per litter with low birth weight piglet (LBW). Low birth weight piglets show higher rates of mortality and lower growth. These high mortality rates raise ethical questions about the justification for pig farming, which contrasts with the principles of resource-efficient animal husbandry. Lower growth rates in LBW are linked to economic losses as well as dysfunctional development of the small intestine. Previous studies have demonstrated the beneficial impact of glutamine supplementation (Gln) on growth and intestinal development parameters in weaned piglets. Since Gln, a conditionally essential amino acid, is intensively metabolized in the epithelial cells of the small intestine, it may potentially normalize the development of the small intestine in LBW.

The study aimed to examine the acute and potential persistent impact of neonatal Gln supplementation in male uncastrated piglets on growth and various parameters of jejunal development.

Male uncastrated suckling piglets in a feeding experiment were analyzed in this trial. The piglets were chosen in pairs from the offspring of gilts based on their birth weight, with selection thresholds of 0.8-1.2 kg for LBW and 1.4-1.8 kg for normal weight piglets (NBW). Selected piglets were supplemented with either 1 g/kg body weight (BW) of Gln or an isonitrogenous amount of alanine (Ala) (1,22 g/kg BW) between the first and 12th day of life. The experimental design resulted in four experimental groups (LBW-Gln, NBW-Gln, LBW-Ala, NBW-Ala), ($n = 36$ /experimental group). The experimental animals had the opportunity to suckle the sow and were offered creep feed starting from the 14th day of life. The piglets' growth was regularly monitored through weighing and additional zootechnical measurements. One-third of each experimental group was euthanized on the fifth, twelfth, and twenty-sixth day of life, and the distal jejunum, along with chyme, was sampled for further analysis. Animals in the experimental groups received bromodeoxyuridine (BrdU) intraperitoneally one hour prior to euthanasia to assess cell proliferation rate, and L-²H₅-phenylalanine to determine fractional protein synthesis rate (FPSR). In addition, the deuterium oxide method was used to determine milk intake on the eleventh and twenty-fifth day of life in the corresponding groups.

The parameters assessed for jejunal development showed only minor impact by both LBW and Gln supplementation. Notably, the concentration of amino acids from supplementation

was alike in both the sampled jejunal tissue and chyme across groups. Consequently, no distinctions in terms of morphology, immune cell population, and FPSR were observed within the jejunal tissues. No influence of Gln on mRNA abundance of genes regulating amino acid transport, amino acid metabolism, and glutathione metabolism was detected. Only minor differences were observed between birth weight groups for respective parameters. The age of piglets had the strongest effect on jejunal development parameters. Differences in morphology, amino acid patterns, cell population, nucleic acid concentration, and mRNA abundance of glutathione metabolism genes were observed between twelve-day-old and five-day-old piglets.

From day 11 to day 21 of the study, the BW of LBW-Gln was higher than the BW of LBW-Ala. However, at the end of the study at 26 days of age, there was no difference in BW between LBW-Gln and LBW-Ala. Higher BW of LBW-Gln could only be linked to an increase in jejunal absorptive area, but not to other differences in intestinal developmental parameters. Compared to LBW, NBW had higher growth rate and BW. It was not possible to deduce a negative impact of LBW on intestinal development based on the measured jejunal development parameters. Additionally, differences in jejunal development parameters, including cell proliferation rate, cell population, and morphology, were observed between 12-day-old and 26-day-old piglets.

In conclusion, oral Gln supplementation marginally improved the growth of LBW piglets, but had very little effect on jejunal development parameters. Furthermore, it was found that low birth weight was not associated with impaired jejunal developmental and which was not responsible for the slower growth of LBW piglets. Finally, it was shown that ontogenetic factors in particular influence jejunal development parameters.

9. Literaturverzeichnis

Adeola, O. and D. E. King (2006):

Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs.

J. Anim. Sci. 84: 112-118. DOI: 10.2527/2006.841112x.

Al Masri, S., H. Hunigen, A. Al Aiyan, J. Rieger, J. Zentek, K. Richardson and J. Plendl (2015):
Influence of age at weaning and feeding regimes on the postnatal morphology of the porcine small intestine.

J SWINE HEALTH PROD. 23: 186-203.

Amdi, C., U. Krogh, C. Flummer, N. Oksbjerg, C. F. Hansen and P. K. Theil (2013):

Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum.

J. Anim. Sci. 91: 5605-5613. DOI: 10.2527/jas.2013-6824.

Andersen, I. L., E. Nævdal and K. E. Bøe (2011):

Maternal investment, sibling competition, and offspring survival with increasing litter size and parity in pigs (*Sus scrofa*).

Behav. Ecol. Sociobiol. 65: 1159-1167. DOI: 10.1007/s00265-010-1128-4.

Arii, K., T. Kai and Y. Kokuba (1999):

Degradation kinetics of L-alanyl-L-glutamine and its derivatives in aqueous solution.

Eur. J. Pharm. Sci. 7: 107-112. DOI: 10.1016/S0928-0987(98)00012-8.

Arnaud, A. P., V. Rome, M. Richard, M. Formal, S. David-Le Gall and G. Boudry (2020):

Post-natal co-development of the microbiota and gut barrier function follows different paths in the small and large intestine in piglets.

FASEB J 34: 1430-1446. DOI: 10.1096/fj.201902514R.

Aschenbach, J. R. B., Gerhard; Dengler, Franziska; Diener, Martin; Elfers, Kristin; Gäbel, Gotthold; Heilmann, Romy Monika; Mazzuoli-Weber, Gemma; Pees, Michael; Pfannkuche, Helga; Reiko, Rackwitz; von Engelhardt, Wolfgang; Wolfram, Siegfried (2022):

Verdauung und Resorption der Proteine.

In: Physiologie der Haustiere/ Hrsg.: G. Breves, M. Diener and G. Gäbel,

6. Auflage, S. 444-448

Stuttgart; Georg Thieme, Verlag KG - ISBN 9783132438354.

Auldist, D. E., F. L. Stevenson, M. G. Kerr, P. Eason and R. H. King (1997):

Lysine requirements of pigs from 2 to 7 kg live weight.

J. Anim. Sci. 65: 501-507. DOI: 10.1017/S1357729800008705.

Ayuso, M., R. Irwin, C. Walsh, S. Van Cruchten and C. Van Ginneken (2021):

Low birth weight female piglets show altered intestinal development, gene expression, and epigenetic changes at key developmental loci.

FASEB J. 35: e21522. DOI: 10.1096/fj.202002587R.

Ball, R. O., J. L. Atkinson and H. S. Bayley (1986):

Proline as an essential amino acid for the young pig.

Br J Nutr. 55: 659-668. DOI: 10.1079/bjn19860072.

Bandrick, M., C. Ariza-Nieto, S. K. Baidoo and T. W. Molitor (2014):

Colostrum antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets.

Dev Comp Immunol. 43: 114-120. DOI: 10.1016/j.dci.2013.11.005.

Bauer, R., B. Walter, A. Hoppe, E. Gaser, V. Lampe, E. Kauf and U. Zwiener (1998):

Body weight distribution and organ size in newborn swine (*sus scrofa domestica*) -- a study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation.

Exp Toxicol Pathol. 50: 59-65. DOI: 10.1016/s0940-2993(98)80071-7.

Baumann, S., S. Stephanie, G. Eva and J. Thomas (2012):

Untersuchungen zur automatischen Milchfütterung von Saugferkeln.

Landtechnik 67. DOI: 10.1515/lt.2012.593.

Baxter, E. M., S. Jarvis, J. Palarea-Albaladejo and S. A. Edwards (2012):

The weaker sex? The propensity for male-biased piglet mortality.

Plos One. 7: e30318. DOI: 10.1371/journal.pone.0030318.

Beaulieu, A. D., J. L. Aalhus, N. H. Williams and J. F. Patience (2010):

Impact of piglet birth weight, birth order, and litter size on subsequent growth performance, carcass quality, muscle composition, and eating quality of pork.

J. Anim. Sci. 88: 2767-2778. DOI: 10.2527/jas.2009-2222.

Benítez-Marín, M. J., J. Marín-Clavijo, J. A. Blanco-Elena, J. Jiménez-López and E. González-Mesa (2021):

Brain Sparing Effect on Neurodevelopment in Children with Intrauterine Growth Restriction: A Systematic Review.

Children (Basel) 8. DOI: 10.3390/children8090745.

Bertolo, R. F. and D. G. Burrin (2008):

Comparative aspects of tissue glutamine and proline metabolism.

J Nutr. 138: 2032S-2039S. DOI: 10.1093/jn/138.10.2032S.

Bertolo, R. F., P. B. Pencharz and R. O. Ball (1999):

A comparison of parenteral and enteral feeding in neonatal piglets, including an assessment of the utilization of a glutamine-rich, pediatric elemental diet.

JPEN J Parenter Enteral Nutr 23: 47-55. DOI: 10.1177/014860719902300247.

Björkman, S. and A. Grahofer (2020):

Tools and Protocols for Managing Hyperprolific Sows at Parturition: Optimizing Piglet Survival and Sows' Reproductive Health

1. überarbeitete Auflage, Helsinki, Intechopen

ISBN: 978-1-83881-938-5

Brandt, H. (2014):

Genetic Parameter for Litter Quality Traits.

10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, Vancouver, American Association of Animal Science

Branitzki-Heinemann, K. F., Herbert; von Köckritz-Blickwede, Maren; Hottiger, Michael O. (2020):

Hydrolytische Desaminierung von Glutamin und Asparagin.

In Biochemie für die Tiermedizin. Hrsg.: W. Kues and M. von Köckritz-Blickwede, Georg, 1 Auflage, S 324

Stuttgart, Thieme Verlag KG - ISBN: 9783132401655.

Bröer, S. and S. J. Fairweather (2018):

Amino Acid Transport Across the Mammalian Intestine.

Compr. Physiol. 9: 343-373. DOI: 10.1002/cphy.c170041.

Brunton, J. A., R. F. Bertolo, P. B. Pencharz and R. O. Ball (1999):

Proline ameliorates arginine deficiency during enteral but not parenteral feeding in neonatal piglets.

Am J Physiol. 277: E223-231. DOI: 10.1152/ajpendo.1999.277.2.E223.

Buddington, R. K. (2002):

Chapter 18 Intestinal absorption of nutrients during early development of vertebrates: patterns of appearance and change.

In: *Biology of the Intestine in Growing Animals* / Hrsg.: R. Zabielski, P. C. Gregory, B. Weström and E. Salek, 1. Auflage, S. 539-562

Amsterdam: Elsevier

ISBN: 9780444509284

Buddington, R. K., J. Elnif, A. A. Puchal-Gardiner and P. T. Sangild (2001):

Intestinal apical amino acid absorption during development of the pig.

Am J Physiol. 280: R241-247. DOI: 10.1152/ajpregu.2001.280.1.R241.

Cabrera, R. A., J. L. Usry, C. Arrellano, E. T. Nogueira, M. Kutschenko, A. J. Moeser and J. Odle (2013):

Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets.

JASB. 4: 29. DOI: 10.1186/2049-1891-4-29.

Cardinal, K. M., M. S. Vieira, M. B. Warpechowski, P. K. Ziegelmann, L. Montagne, I. Andretta and A. M. L. Ribeiro (2020):

Modeling nutritional and performance factors that influence the efficiency of weight gain in relation to excreted nitrogen in weaning piglets.

Anim. 14: 261-267. DOI: 10.1017/S1751731119001587.

Chalvon-Demersay, T., D. Luise, N. Le Floc'h, S. Tesserand, W. Lambert, P. Bosi, P. Trevisi, M. Beaumont and E. Corrent (2021):

Functional Amino Acids in Pigs and Chickens: Implication for Gut Health.

Front. vet. sci. 8. DOI: 10.3389/fvets.2021.663727.

Craig, J. R., F. R. Dunshea, J. J. Cottrell, J. B. Furness, U. A. Wijesiriwardana and J. R. Pluske (2019):

A comparison of the anatomical and gastrointestinal functional development between gilt and sow progeny around birth and weaning¹.

J. Anim. Sci 97: 3809-3822. DOI: 10.1093/jas/skz217.

- Cruzat, V., M. Macedo Rogero, K. Noel Keane, R. Curi and P. Newsolme (2018):
Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation.
Nutrients 10. DOI: 10.3390/nu10111564.
- D'Inca, R., C. Gras-Le Guen, L. Che, P. T. Sangild and I. Le Huerou-Luron (2011):
Intrauterine growth restriction delays feeding-induced gut adaptation in term newborn pigs.
Neonatology 99: 208-216. DOI: 10.1159/000314919.
- D'Inca, R., M. Kloareg, C. Gras-Le Guen and I. Le Huerou-Luron (2010):
Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure,
transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs.
J. Nutr. 140: 925-931. DOI: 10.3945/jn.109.116822.
- Darcy-Vrillon, B., L. Posho, M. T. Morel, F. Bernard, F. Blachier, J. C. Meslin and P. H. Duée
(1994):
Glucose, galactose, and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during
development.
Pediatr Res. 36: 175-181. DOI: 10.1203/00006450-199408000-00007.
- Davis, T. A., M. L. Fiorotto, D. G. Burrin, W. G. Pond and H. V. Nguyen (1997):
Intrauterine growth restriction does not alter response of protein synthesis to feeding in
newborn pigs.
Am J Physiol. 272: E877-884. DOI: 10.1152/ajpendo.1997.272.5.E877.
- Davis, T. A., H. V. Nguyen, R. Garcia-Bravo, M. L. Fiorotto, E. M. Jackson, D. S. Lewis, D. R.
Lee and P. J. Reeds (1994):
Amino acid composition of human milk is not unique.
J. Nutr. 124: 1126-1132. DOI: 10.1093/jn/124.7.1126.
- Davis, T. A., A. Suryawan, R. A. Orellana, M. L. Fiorotto and D. G. Burrin (2010):
Amino acids and insulin are regulators of muscle protein synthesis in neonatal pigs.
Anim. 4: 1790-1796. DOI: 10.1017/s1751731110000984.
- de Greeff, A., J. W. Resink, H. M. van Hees, L. Ruuls, G. J. Klaassen, S. M. Rouwers and N.
Stockhofe-Zurwieden (2016):
Supplementation of piglets with nutrient-dense complex milk replacer improves intestinal
development and microbial fermentation.
J. Anim. Sci 94: 1012-1019. DOI: 10.2527/jas.2015-9481.

De Vos, M., L. Che, V. Huygelen, S. Willemen, J. Michiels, S. Van Cruchten and C. Van Ginneken (2014a):

Nutritional interventions to prevent and rear low-birthweight piglets.

J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 98: 609-619. DOI: 10.1111/jpn.12133.

De Vos, M., V. Huygelen, G. Van Raemdonck, S. Willemen, E. Fransen, X. Van Ostade, C. Casteleyn, S. Van Cruchten and C. Van Ginneken (2014b):

Supplementing formula-fed piglets with a low molecular weight fraction of bovine colostrum whey results in an improved intestinal barrier.

J. Anim. Sci. 92: 3491-3501. DOI: 10.2527/jas.2013-6437.

Declerck, I., J. Dewulf, S. Sarrazin and D. Maes (2016):

Long-term effects of colostrum intake in piglet mortality and performance.

J. Anim. Sci. 94: 1633-1643. DOI: 10.2527/jas.2015-9564.

Degroote, J., H. Vergauwen, W. Wang, C. Van Ginneken, S. De Smet and J. Michiels (2020):

Changes of the glutathione redox system during the weaning transition in piglets, in relation to small intestinal morphology and barrier function.

J Anim Sci Biotechnol. 11: 45. DOI: 10.1186/s40104-020-00440-7.

Dekaney, C. M., F. W. Bazer and L. A. Jaeger (1997):

Mucosal morphogenesis and cytodifferentiation in fetal porcine small intestine.

Anat Rec. 249: 517-523. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199712)249:4<517::AID-AR12>3.0.CO;2-R.

Devillers, N., C. Farmer, J. Le Dividich and A. Prunier (2007):

Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs.

Anim. 1: 1033-1041. DOI: 10.1017/S175173110700016X.

Devillers, N., J. Le Dividich and A. Prunier (2011):

Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity.

Anim. 5: 1605-1612. DOI: 10.1017/s175173111100067x.

Douglas, S. L., S. A. Edwards and I. Kyriazakis (2014):

Management strategies to improve the performance of low birth weight pigs to weaning and their long-term consequences.

J. Anim. Sci 92: 2280-2288. DOI: 10.2527/jas.2013-7388.

- Duttlinger, A. W., K. R. Kpodo, D. C. Lay, B. T. Richert and J. S. Johnson (2019):
Replacing dietary antibiotics with 0.20% l-glutamine in swine nursery diets: impact on health and productivity of pigs following weaning and transport.
J. Anim. Sci 97: 2035-2052. DOI: 10.1093/jas/skz098.
- Edwards, S. A. (2002):
Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions?
Livest. Prod. Sci. 78: 3-12. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00180-X.
- Eisemann, J., H. Lewis, A. Broome, K. Sullivan, R. Boyd, J. Odle and R. Harrell (2014):
Lysine requirement of 1.5–5.5 kg pigs fed liquid diets.
Anim. Prod. Sci. 54: 608. DOI: 10.1071/AN12280.
- Everaert, N., S. Van Cruchten, B. Westrom, M. Bailey, C. Van Ginneken, T. Thymann and R. Pieper (2017):
A review on early gut maturation and colonization in pigs, including biological and dietary factors affecting gut homeostasis.
Anim Feed Sci Technol. 233: 89-103. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.06.011.
- Ewaschuk, J. B., G. K. Murdoch, I. R. Johnson, K. L. Madsen and C. J. Field (2011):
Glutamine supplementation improves intestinal barrier function in a weaned piglet model of Escherichia coli infection.
Br J Nutr. 106: 870-877. DOI: 10.1017/S0007114511001152.
- Farmer, C. (2014):
The gestating and lactating sow.
1. überarbeitete Auflage, Wageningen, Wageningen Academic Publishers
ISBN: 978-90-8686-253-5
- Farmer, C. (2020):
The Suckling and Weaned Piglet.
1. überarbeitete Auflage, Wageningen, Wageningen Academic Publishers
ISBN: 978-90-8686-343-3
- Farmer, C., N. Devillers, J. Rooke and J. Le Dividich (2006):
Colostrum production in swine: from the mammary glands to the piglets.
Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour. (2006) 1: No 003, 016 pp. DOI:
10.1079/PAVSNR20061003

- Feng, X. T., Y. Z. Xiong, H. Qian, M. G. Lei, D. Q. Xu and Z. Q. Ren (2010):
Selection of reference genes for gene expression studies in porcine skeletal muscle using SYBR green qPCR.
J. Biotech. 150: 288-293. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.949.
- Ferenc, K., T. Pilzys, T. Skrzypek, D. Garbicz, M. Marcinkowski, M. Dylewska, P. Gladysz, O. Skorobogatov, Z. Gajewski, E. Grzesiuk and R. Zabielski (2017):
Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates.
Dis. Markers. 2017: 5238134. DOI: 10.1155/2017/5238134.
- Foxcroft, G. R., W. T. Dixon, M. K. Dyck, S. Novak, J. C. Harding and F. C. Almeida (2009):
Prenatal programming of postnatal development in the pig.
Soc Reprod Fertil Suppl.. 66: 213-231.
- Freisfeld, R. H. G. (2000):
EZG für Ferkel – Jahresbericht 2000.
Erzeugerbericht Erzeugerring Westfalen: 55-57.
- Gallagher, D. P., P. F. Cotter and D. M. Mulvihill (1997):
Porcine milk proteins: A review.
Int. Dairy J. 7: 99-118. DOI: 10.1016/S0958-6946(96)00056-8.
- Geiping, L. and E. große Beilage (2020):
Mortalität bei neonatalen Saugferkeln – eine Literaturübersicht zu Umfang und Risikofaktoren.
PRAKT TIERARZT. 101: 280–291. DOI: 10.2376/0032-681x-2001.
- Getty, C. M., F. N. Almeida, A. A. Baratta and R. N. Dilger (2015):
Plasma metabolomics indicates metabolic perturbations in low birth weight piglets supplemented with arginine.
J. Anim. Sci.93: 5754-5763. DOI: 10.2527/jas.2015-9293.
- Gilda, J., R. Ghosh, J. Cheah, T. West, S. Bodine and A. Gomes (2015):
Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS).
Plos One. 10: e0135392. DOI: 10.1371/journal.pone.0135392.

Gonzalez, L. M., I. Williamson, J. A. Piedrahita, A. T. Blikslager and S. T. Magness (2013):
Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration.

Plos One. 8: e66465. DOI: 10.1371/journal.pone.0066465.

Große Beilage, E. and M. Wendt (2013):

Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand.

1. überarbeitete Auflage, Stuttgart, Eugen Ulmer KG

ISBN: 9783825285029

Hales, J., V. A. Moustsen, M. B. Nielsen and C. F. Hansen (2013):

Individual physical characteristics of neonatal piglets affect preweaning survival of piglets born in a noncrated system.

J. Anim. Sci. 91: 4991-5003. DOI: 10.2527/jas.2012-5740.

Han, F., L. Hu, Y. Xuan, X. Ding, Y. Luo, S. Bai, S. He, K. Zhang and L. Che (2013):

Effects of high nutrient intake on the growth performance, intestinal morphology and immune function of neonatal intra-uterine growth-retarded pigs.

Br J Nutr. 110: 1819-1827. DOI: 10.1017/s0007114513001232.

Hanczakowska, E. (2014):

Effect of dietary glutamine, glucose and/or sodium butyrate on piglet growth, intestinal environment, subsequent fattener performance, and meat quality.

Czech J. Anim. Sci., 59, 2014 (10): 460–470

Hanczakowska, E. and B. Niwinska (2013):

Glutamine as a Feed Supplement for Piglets: A Review.

Ann. Anim. Sci. 13: 5-15. DOI: 10.2478/v10220-012-0054-y.

Harrell, R. J., M. J. Thomas and R. D. Boyd (1993):

Limitations of sow milk yield on baby pig growth.

Proceedings - Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.: S 156-164.

ISSN: 0885-7687

Haynes, T. E., P. Li, X. Li, K. Shimotori, H. Sato, N. E. Flynn, J. Wang, D. A. Knabe and G. Wu (2009):

L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant- or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes.

Amino Acids. 37: 131-142. DOI: 10.1007/s00726-009-0243-x.

He, Y., X. Fan, N. Liu, Q. Song, J. Kou, Y. Shi, X. Luo, Z. Dai, Y. Yang, Z. Wu and G. Wu (2019):

I-Glutamine Represses the Unfolded Protein Response in the Small Intestine of Weanling Piglets.

J. Nutr. 149: 1904-1910. DOI: 10.1093/jn/nxz155.

Herpin, P., M. Damon and J. Le Dividich (2002):

Development of thermoregulation and neonatal survival in pigs.

Livest. Prod. Sci. 78: 25-45. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00183-5.

Herpin, P., J. Le Dividich, D. Berthon and J. C. Hulin (1994):

Assessment of thermoregulatory and postprandial thermogenesis over the first 24 hours after birth in pigs.

Exp Physiol. 79: 1011-1019. DOI: 10.1113/expphysiol.1994.sp003815.

Hill, S. V., M. Del Rocio Amezcua, E. S. Ribeiro, T. L. O'Sullivan and R. M. Friendship (2022):
Defining the Effect of Oxytocin Use in Farrowing Sows on Stillbirth Rate: A Systematic Review with a Meta-Analysis.

Animals (Basel). 12. DOI: 10.3390/ani12141795.

Hojgaard, C. K., T. S. Bruun and P. K. Theil (2020):

Impact of milk and nutrient intake of piglets and sow milk composition on piglet growth and body composition at weaning.

J. Anim. Sci. 98. DOI: 10.1093/jas/skaa060.

Hou, L., C. Y. Hu and C. Wang (2017):

Pig Has No Brown Adipose Tissue.

FASEB J 31: 1b695-1b695. DOI: https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.1b695.

Huting, A. M. S., A. Middelkoop, X. Guan and F. Molist (2021):

Using Nutritional Strategies to Shape the Gastro-Intestinal Tracts of Suckling and Weaned Piglets.

Animals (Basel) 11. DOI: 10.3390/ani11020402.

Huting, A. M. S., P. Sakkas, I. Wellock, K. Almond and I. Kyriazakis (2018):

Once small always small? To what extent morphometric characteristics and post-weaning starter regime affect pig lifetime growth performance.

Porcine Health Manag. 4: 21. DOI: 10.1186/s40813-018-0098-1.

Huygelen, V., M. De Vos, S. Prims, H. Vergauwen, E. Fransen, C. Casteleyn, S. Van Cruchten and C. Van Ginneken (2015):

Birth weight has no influence on the morphology, digestive capacity and motility of the small intestine in suckling pigs.

Livest. Sci. 182: 129-136. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.11.003.

Huygelen, V., M. De Vos, S. Willemen, E. Fransen, C. Casteleyn, S. Van Cruchten and C. Van Ginneken (2014a):

Age-related differences in mucosal barrier function and morphology of the small intestine in low and normal birth weight piglets.

J. Anim. Sci 92: 3398-3406. DOI: 10.2527/jas.2014-7742.

Huygelen, V., M. De Vos, S. Willemen, H. Vergauwen, C. Casteleyn, S. Van Cruchten and C. Van Ginneken (2014b):

Effect of low birth weight on the small intestinal defence function in neonatal piglets.

Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 79: 71-76.

Jacobson, M. (2022):

On the Infectious Causes of Neonatal Piglet Diarrhoea-A Review.

Vet. Sci. 9. DOI: 10.3390/vetsci9080422.

Jang, K. B. and S. W. Kim (2022):

Role of milk carbohydrates in intestinal health of nursery pigs: a review.

J Anim Sci Biotechnol 13: 6. DOI: 10.1186/s40104-021-00650-7.

Ji, F. J., L. X. Wang, H. S. Yang, A. Hu and Y. L. Yin (2019):

Review: The roles and functions of glutamine on intestinal health and performance of weaning pigs.

Anim. 13: 2727-2735. DOI: 10.1017/s1751731119001800.

Ji, Y., Y. Sun, N. Liu, H. Jia, Z. Dai, Y. Yang and Z. Wu (2022):

L-leucine supplementation reduces growth performance accompanied by changed profiles of plasma amino acids and expression of jejunal amino acid transporters in breast-fed intra-uterine growth-retarded piglets.

Br. J. Nutr. 1-33. DOI: 10.1017/s0007114522002823.

Jung, K., T. Annamalai, Z. Lu and L. J. Saif (2015):

Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs.

Vet Microbiol. 178: 31-40. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.04.022.

Kamphues, P. D. J., J. Kamphues, P. Wolf, M. Coenen, K. Eder, C. Iben, E. Kienzle, A. Liesegang, K. Männer and Q. Zebeli (2014):

Supplemente zur Tierernährung für Studium und Praxis

12., überarbeitete Auflage, Hannover: M & H Schaper

ISBN-13: 978-3-7944-0240-3

Khan, K. and M. Elia (1991):

Factors affecting the stability of L-glutamine in solution.

Clin Nutr. 10: 186-192. DOI: 10.1016/0261-5614(91)90037-d.

Kim, M. H. and H. Kim (2017):

The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases.

Int J Mol Sci. 18. DOI: 10.3390/ijms18051051.

Kim, S. W. and G. Wu (2004):

Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs.

J Nutr. 134: 625-630. DOI: 10.1093/jn/134.3.625.

Kitt, S. J. (2004):

Effects of Sow Dietary Glutamine Supplementation on Sow and Litter Performance, Subsequent Weanling Pig Performance and Intestinal Development After an Immune Challenge.

Nebraska Swine Reports 15, 14-17

Ko, T. C., R. D. Beauchamp, C. M. Townsend, Jr. and J. C. Thompson (1993):

Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation.

Surgery (Oxf) 114: 147-153; discussion 153-144.

Kobek-Kjeldager, C., V. A. Moustsen, P. K. Theil and L. J. Pedersen (2020a):

Effect of litter size, milk replacer and housing on behaviour and welfare related to sibling competition in litters from hyper-prolific sows.

Appl. Anim. Behav. Sci. 230: 105032. DOI: 10.1016/j.applanim.2020.105032.

Kobek-Kjeldager, C., V. A. Moustsen, P. K. Theil and L. J. Pedersen (2020b):

Effect of litter size, milk replacer and housing on production results of hyper-prolific sows.
Anim. 14: 824-833. DOI: 10.1017/S175173111900260X.

Kongsted, H., N. Toft and J. P. Nielsen (2014):

Risk factors and epidemiological characteristics of new neonatal porcine diarrhoea syndrome in four Danish herds.
BMC Vet. Res. 10: 151. DOI: 10.1186/1746-6148-10-151.

Krueger, R., M. Derno, S. Goers, B. U. Metzler-Zebeli, G. Nuernberg, K. Martens, R. Pfuhl, C. Nebendahl, A. Zeyner, H. M. Hammon and C. C. Metges (2014):

Higher body fatness in intrauterine growth retarded juvenile pigs is associated with lower fat and higher carbohydrate oxidation during ad libitum and restricted feeding.
Eur J Nutr. 53: 583-597. DOI: 10.1007/s00394-013-0567-x.

Li, G., J. Li, B. Tan, J. Wang, X. Kong, G. Guan, F. Li and Y. Yin (2015):

Characterization and Regulation of the Amino Acid Transporter SNAT2 in the Small Intestine of Piglets.
Plos One 10: e0128207. DOI: 10.1371/journal.pone.0128207.

Li, Z., Q. L. Sciascia, S. Görs, N. Nguyen, F. Rayatdoost Baghal, J. Schregel, A. Tuchscherer, J. Zentek and C. C. Metges (2022):

Glutamine supplementation moderately affects growth, plasma metabolite and free amino acid patterns in neonatal low birthweight piglets.
Br. J. Nutr.: 1-32. DOI: 10.1017/S0007114522000459.

Liao, S. F., T. Wang and N. Regmi (2015):

Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond.
Springerplus 4: 147-147. DOI: 10.1186/s40064-015-0927-5.

Lin, M., B. Zhang, C. Yu, J. Li, L. Zhang, H. Sun, F. Gao and G. Zhou (2014):

L-Glutamate supplementation improves small intestinal architecture and enhances the expressions of jejunal mucosa amino acid receptors and transporters in weaning piglets.
Plos One 9: e111950. DOI: 10.1371/journal.pone.0111950.

Luise, D., T. Chalvon-Demersay, F. Correa, P. Bosi and P. Trevisi (2023):

Review: A systematic review of the effects of functional amino acids on small intestine barrier function and immunity in piglets.

Anim.: 100771. DOI: 10.1016/j.animal.2023.100771.

Lynegaard, J. C., J. Hales, M. N. Nielsen, C. F. Hansen and C. Amdi (2020):

The Stomach Capacity is Reduced in Intrauterine Growth Restricted Piglets Compared to Normal Piglets.

Animals (Basel) 10. DOI: 10.3390/ani10081291.

Lynegaard, J. C., C. F. Hansen, A. R. Kristensen and C. Amdi (2019):

Body composition and organ development of intra-uterine growth restricted pigs at weaning.

Anim.: 1-8. DOI: 10.1017/s175173111900171x.

Manso, H. E., H. C. Filho, L. E. de Carvalho, M. Kutschenko, E. T. Nogueira and M. Watford (2012):

Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts.

J Anim Sci Biotechnol. 3: 2. DOI: 10.1186/2049-1891-3-2.

Marchant, J. N., A. R. Rudd, M. T. Mendl, D. M. Broom, M. J. Meredith, S. Corning and P. H. Simmins (2000):

Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems.

Vet. Rec. 147: 209-214. DOI: 10.1136/vr.147.8.209.

Marini, J. C., U. Agarwal, J. L. Robinson, Y. Yuan, I. C. Didelija, B. Stoll and D. G. Burrin (2017):

The intestinal-renal axis for arginine synthesis is present and functional in the neonatal pig.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 313: E233-e242. DOI: 10.1152/ajpendo.00055.2017.

Mbuthia, J. M. K., C.; Zenk, M.; Bee, G.; Metges, C. C.; Daş, G. (2023):

Prediction of piglet survival by using birth weight and within-litter birth weight.

Book of Abstracts 74th EAAP Annual Meeting, Lyon, Wageningen Academic Publishers

Mickiewicz, M., R. Zabielski, B. Grenier, L. Le Normand, G. Savary, J. J. Holst, I. P. Oswald, C. C. Metges and P. Guilloteau (2012):

Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy.

J Physiol Pharmacol 63: 225-239.

Moeser, A. J., C. S. Pohl and M. Rajput (2017):

Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs.

Animal Nutrition. 3: 313-321. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.06.003.

Morise, A., I. Louveau and I. Le Huerou-Luron (2008):

Growth and development of adipose tissue and gut and related endocrine status during early growth in the pig: impact of low birth weight.

Anim. 2: 73-83. DOI: 10.1017/S175173110700095X.

Mugnier, A., S. Chastant, F. Lyazrhi, C. Saegerman and A. Grellet (2023):

Definition of low birth weight in domestic mammals: a scoping review.

Anim. Health Res. Rev.: 1-8. DOI: 10.1017/s146625232200007x.

Muns, R. and E. Magowan (2018):

The effect of creep feed intake and starter diet allowance on piglets' gut structure and growth performance after weaning.

J. Anim. Sci 96: 3815-3823. DOI: 10.1093/jas/sky239.

Muro, B. B. D., R. F. Carnevale, I. Andretta, D. F. Leal, M. S. Monteiro, A. P. Poor, G. W. Almond and C. A. P. Garbossa (2021):

Effects of uterotonics on farrowing traits and piglet vitality: A systematic review and meta-analysis.

Theriogenology. 161: 151-160. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.12.003.

National Research Council. (2012):

Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition.

Washington, DC, The National Academies Press.

ISBN: 978-0-309-22426-0

Nebendahl, C., R. Kruger, S. Gors, E. Albrecht, K. Martens, S. Hennig, N. Storm, W. Hoppner, R. Pfuhl, B. U. Metzler-Zebeli, H. M. Hammon and C. C. Metges (2013):

Effects on transcriptional regulation and lipid droplet characteristics in the liver of female juvenile pigs after early postnatal feed restriction and refeeding are dependent on birth weight.

Plos One. 8: e76705. DOI: 10.1371/journal.pone.0076705.

Ngendahayo Mukiza, C. and J. D. Dubreuil (2013):

Escherichia coli heat-stable toxin b impairs intestinal epithelial barrier function by altering tight junction proteins.

Infect Immun. 81: 2819-2827. DOI: 10.1128/iai.00455-13.

Nicole de Buhr, M. v. K.-B., Hassan Y. Naim (2020):

Abbau der einzelnen Aminosäuren.

In: Biochemie für die Tiermedizin/ Hrsg.: W. Kues and M. von Köckritz-Blickwede, 1. Auflage, S. 322 -324

Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG

ISBN 9783132401655

Nygaard, A. B., C. B. Jorgensen, S. Cirera and M. Fredholm (2007):

Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR.

BMC Mol. Biol. 8: 67. DOI: 10.1186/1471-2199-8-67.

Oliviero, C., S. Junnikkala and O. Peltoniemi (2019):

The challenge of large litters on the immune system of the sow and the piglets.

Reprod. Domest. Anim. 54 Suppl 3: 12-21. DOI: 10.1111/rda.13463.

Olszewski, J., R. Zabielski, T. Skrzypek, P. Matyba, M. Wierzbicka, A. Adamski, E. Grzesiuk, M. Sady, Z. Gajewski and K. Ferenc (2021):

Differences in Intestinal Barrier Development between Intrauterine Growth Restricted and Normal Birth Weight Piglets.

Animals (Basel) 11: 990. DOI: 10.3390/ani11040990.

Pieper, R., L. Scharek-Tedin, A. Zetzsche, I. Rohe, S. Kroger, W. Vahjen and J. Zentek (2016):

Bovine milk-based formula leads to early maturation-like morphological, immunological, and functional changes in the jejunum of neonatal piglets.

J. Anim. Sci. 94: 989-999. DOI: 10.2527/jas.2015-9942.

Pluske, J. R., D. L. Turpin and J. C. Kim (2018):

Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig.

Animal Nutrition. 4: 187-196. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.12.004.

Posey, E. A. and T. A. Davis (2023):

Review: Nutritional regulation of muscle growth in neonatal swine.

Anim. 17 Suppl 3: 100831. DOI: 10.1016/j.animal.2023.100831.

Posho, L., B. Darcyvrillon, F. Blachier and P. H. Duee (1994):

The Contribution of Glucose and Glutamine to Energy-Metabolism in Newborn Pig Enterocytes.

J Nutr Biochem. 5: 284-290. DOI: Doi 10.1016/0955-2863(94)90033-7.

Quesnel, H., C. Farmer and N. Devillers (2012):

Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation.

Livest. Sci. 146: 105-114. DOI: 10.1016/j.livsci.2012.03.010.

Quesnel, H., R. Resmond, E. Merlot, M. C. Père, F. Gondret and I. Louveau (2023):

Physiological traits of newborn piglets associated with colostrum intake, neonatal survival and preweaning growth.

Anim. 17: 100843. DOI: 10.1016/j.animal.2023.100843.

Quiniou, N., J. Dagorn and D. Gaudre (2002):

Variation of piglets birth weight and consequences on subsequent performance.

Livest. Prod. Sci 78: 63-70. DOI: Pii S0301-6226(02)00181-1

DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00181-1.

Raleigh, D. R., A. M. Marchiando, Y. Zhang, L. Shen, H. Sasaki, Y. Wang, M. Long and J. R. Turner (2010):

Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions.

Mol Cell Biol. 21: 1200-1213. DOI: 10.1091/mbc.E09-08-0734.

Rasch, I., S. Gors, A. Tuchscherer, J. K. Htoo, B. Kuhla and C. C. Metges (2019a):

Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by DL-2-hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Increases Remethylation and Decreases Transsulfuration in Weaned Piglets.

J. Nutr. 149: 432-440. DOI: 10.1093/jn/nxy296.

Rasch, I., S. Gors, A. Tuchscherer, T. Viergutz, C. C. Metges and B. Kuhla (2019b):

Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by dl-2-Hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Reduces Fractional Glutathione Synthesis in Weaned Piglets.

J. Nutr. DOI: 10.1093/jn/nxz272.

Rehfeldt, C., I. S. Lang, S. Gors, U. Hennig, C. Kalbe, B. Stabenow, K. P. Brussow, R. Pfuhl, O. Bellmann, G. Nurnberg, W. Otten and C. C. Metges (2011):

Limited and excess dietary protein during gestation affects growth and compositional traits in gilts and impairs offspring fetal growth.

J. Anim. Sci. 89: 329-341. DOI: 10.2527/jas.2010-2970.

Rezaei, R., D. A. Knabe, C. D. Tekwe, S. Dahanayaka, M. D. Ficken, S. E. Fielder, S. J. Eide, S. L. Lovering and G. Wu (2013):

Dietary supplementation with monosodium glutamate is safe and improves growth performance in postweaning pigs.

Amino Acids 44: 911-923. DOI: 10.1007/s00726-012-1420-x.

Rinken, R. (2020):

Ferkelerzeugung- Jahresergebnis 2018/19

Jahresbericht Erzeugerring Westfalen. 2019: 12-15.

Rootwelt, V., O. Reksen, W. Farstad and T. Framstad (2012):

Associations between intrapartum death and piglet, placental, and umbilical characteristics.

J. Anim. Sci. 90: 4289-4296. DOI: 10.2527/jas.2012-5238.

Rothkötter, H., S. Möllhoff and R. Pabst (1999):

The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs.

Scand. J. Immunol. 50: 31-38. DOI: 10.1046/j.1365-3083.1999.00557.x.

Rothkötter, H. J., H. Ulbrich and R. Pabst (1991):

The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs.

Pediatr Res 29: 237-242. DOI: 10.1203/00006450-199103000-00004.

Sakata, T. and H. Setoyama (1997):

Bi-phasic allometric growth of the small intestine, cecum and the proximal, middle, and distal colon of rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1764) before and after weaning.

Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 118: 897-902. DOI: 10.1016/s0300-9629(97)00222-3.

Salmon, H., M. Berri, V. Gerdtz and F. Meurens (2009):

Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine.

Dev Comp Immunol. 33: 384-393. DOI: 10.1016/j.dci.2008.07.007.

Schregel, J., J. Schulze Holthausen, Q. L. Sciascia, Z. Li, S. Gors, A. Eggert, A. Tuchscherer, J. Zentek and C. C. Metges (2022):

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development, and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets.

Plos One. 17: e0267357. DOI: 10.1371/journal.pone.0267357.

Schulze Holthausen, J., J. Schregel, Q. L. Sciascia, Z. Li, A. Tuchscherer, W. Vahjen, C. C. Metges and J. Zentek (2022):

Effects of Oral Glutamine Supplementation, Birthweight and Age on Colonic Morphology and Microbiome Development in Male Suckling Piglets.

Microorganisms. 10: 1899. DOI: 10.3390/microorganisms10101899

Skrzypek, T., S. Szymanczyk, K. Ferenc, W. Kazimierczak, K. Szczepaniak and R. Zabielski (2018):

The contribution of vacuolated foetal-type enterocytes in the process of maturation of the small intestine in piglets. Invited review.

JAFS. 27: 187-201. DOI: 10.22358/jafs/94167/2018.

Skrzypek, T., J. L. Valverde Piedra, H. Skrzypek, W. Kazimierczak, M. Biernat and R. Zabielski (2007):

Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets.

J Physiol Pharmacol. 58 Suppl 3: 87-95.

Smit, M. N., J. D. Spencer, F. R. Almeida, J. L. Patterson, H. Chiarini-Garcia, M. K. Dyck and G. R. Foxcroft (2013):

Consequences of a low litter birth weight phenotype for postnatal lean growth performance and neonatal testicular morphology in the pig.

Anim. 7: 1681-1689. DOI: 10.1017/s1751731113001249.

Stoll, B. and D. G. Burrin (2006):

Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers.

J. Anim. Sci. 84 Suppl: E60-72. DOI: 10.2527/2006.8413_supple60x.

Sun, Y., Z. Wu, W. Li, C. Zhang, K. Sun, Y. Ji, B. Wang, N. Jiao, B. He, W. Wang, Z. Dai and G. Wu (2015):

Dietary L-leucine supplementation enhances intestinal development in suckling piglets.

Amino Acids. 47: 1517-1525. DOI: 10.1007/s00726-015-1985-2.

Suzuki, T. (2020):

Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions.
Anim. Sci. J. 91: e13357. DOI: 10.1111/asj.13357.

Świąch, E., A. Tuśnio, M. Taciak and M. Barszcz (2022):

Modulation of Mucin Secretion in the Gut of Young Pigs by Dietary Threonine and Non-Essential Amino Acid Levels.
Animals (Basel). 12. DOI: 10.3390/ani12030270.

Theil, P. K., G. Cordero, P. Henckel, L. Puggaard, N. Oksbjerg and M. T. Sørensen (2011):

Effects of gestation and transition diets, piglet birth weight, and fasting time on depletion of glycogen pools in liver and 3 muscles of newborn piglets.
J. Anim. Sci. 89: 1805-1816. DOI: 10.2527/jas.2010-2856.

Theil, P. K., C. Lauridsen and H. Quesnel (2014):

Neonatal piglet survival: impact of sow nutrition around parturition on fetal glycogen deposition and production and composition of colostrum and transient milk.
Anim. 8: 1021-1030. DOI: 10.1017/S1751731114000950.

Tsao, M. and D. E. Otter (1999):

Quantification of glutamine in proteins and peptides using enzymatic hydrolysis and reverse-phase high-performance liquid chromatography.
Anal Biochem. 269: 143-148. DOI: 10.1006/abio.1998.3091.

Van Ginneken, C., M. Ayuso, L. Van Bockstal and S. Van Cruchten (2023):

Prewaning performance in intrauterine growth-restricted piglets: Characteristics and interventions.
Mol Reprod Dev. 90:697–707. DOI: 10.1002/mrd.23614.

van Goudoever, J. B., S. R. D. van der Schoor, B. Stoll, D. G. Burrin, D. Wattimena, H. Schierbeek, M. W. Schaart, M. A. Riedijk and J. v. d. van der Lugt (2006):

Intestinal Amino Acid Metabolism in Neonates.
Protein and Energy Requirements in Infancy and Childhood: 58th Nestlé Nutrition Workshop, Pediatric Program, Ho Chi Minh City, November 2005, S.Karger AG. 58:
DOI: 0.10.1159/000095023978-3-8055-8081-6

van Rens, B. T. and T. van der Lende (2004):

Parturition in gilts: duration of farrowing, birth intervals and placenta expulsion in relation to maternal, piglet and placental traits.

Theriogenology. 62: 331-352. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.008.

Vancamelbeke, M. and S. Vermeire (2017):

The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease.

Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 11: 821-834. DOI: 10.1080/17474124.2017.1343143.

Villagómez Estrada, S., J. Pérez, D. Melo, F. González-Solé, M. D'Angelo, F. Pérez-Cano and D. Solà-Oriol (2022):

Short Communication: Body weight of newborn and suckling piglets affects their intestinal gene expression.

J. Anim. Sci. 100. DOI: 10.1093/jas/skac161.

VzF, G. (2022):

Jahresbericht 2022 der VzF GmbH. Abgerufen am 07.11.2023 um 16:30, von <https://www.vzf-gmbh.de/download>

Wang, B., Z. Wu, Y. Ji, K. Sun, Z. Dai and G. Wu (2016a):

L-Glutamine Enhances Tight Junction Integrity by Activating CaMK Kinase 2-AMP-Activated Protein Kinase Signaling in Intestinal Porcine Epithelial Cells.

J Nutr. 146: 501-508. DOI: 10.3945/jn.115.224857.

Wang, H., C. Zhang, G. Wu, Y. Sun, B. Wang, B. He, Z. Dai and Z. Wu (2015a):

Glutamine enhances tight junction protein expression and modulates corticotropin-releasing factor signaling in the jejunum of weanling piglets.

J Nutr. 145: 25-31. DOI: 10.3945/jn.114.202515.

Wang, J., L. Chen, P. Li, X. Li, H. Zhou, F. Wang, D. Li, Y. Yin and G. Wu (2008):

Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation.

J Nutr. 138: 1025-1032. DOI: 10.1093/jn/138.6.1025.

Wang, J., G. R. Li, B. E. Tan, X. Xiong, X. F. Kong, D. F. Xiao, L. W. Xu, M. M. Wu, B. Huang, S. W. Kim and Y. L. Yin (2015b):

Oral administration of putrescine and proline during the suckling period improves epithelial restitution after early weaning in piglets¹.

J. Anim. Sci. 93: 1679-1688. DOI: 10.2527/jas.2014-8230.

- Wang, J., L. Zeng, G. Li, B. Huang, X. Xiong, F. Li, X. Kong, G. Liu and Y. Yin (2016b):
Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning periods.
J Anim Sci Biotechnol. 7. DOI: 10.1186/s40104-016-0063-2.
- Wang, Q., X. Xiong, J. Li, Q. Tu, H. Yang and Y. Yin (2018a):
Energy metabolism in the intestinal crypt epithelial cells of piglets during the suckling period.
Sci Rep. 8: 12948. DOI: 10.1038/s41598-018-31068-3.
- Wang, Q., X. Xiong, X. Wang, Q. Tu, J. Li, X. Ding, Y. Li, P. Huang, S. He, Y. Yin and H. Yang (2018b):
Suckling Piglet Intestinal Enterocyte Nutrient Metabolism Changes.
Cell Physiol Biochem. 48: 2103-2113. DOI: 10.1159/000492552.
- Wang, W., J. Degroote, C. Van Ginneken, M. Van Poucke, H. Vergauwen, T. M. Dam, D. Vanrompay, L. J. Peelman, S. De Smet and J. Michiels (2016c):
Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes.
FASEB J. 30: 863-873. DOI: 10.1096/fj.15-274779.
- Wang, Y., L. Zhang, G. Zhou, Z. Liao, H. Ahmad, W. Liu and T. Wang (2012):
Dietary L-arginine supplementation improves the intestinal development through increasing mucosal Akt and mammalian target of rapamycin signals in intra-uterine growth retarded piglets.
Br J Nutr. 108: 1371-1381. DOI: 10.1017/s0007114511006763.
- Wessels, A. G., A. Simongiovanni and J. Zentek (2023):
Impact of dietary supplementation of L-Arginine, L-Glutamine, and the combination of both on nursing performance of multiparous sows.
Transl. anim. sci. 7: txac169. DOI: 10.1093/tas/txac169.
- Weström, B., E. Arévalo Sureda, K. Pierzynowska, S. G. Pierzynowski and F. J. Pérez-Cano (2020):
The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals.
Front Immunol. 11: 1153. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01153.

- Wientjes, J. G., N. M. Soede, E. F. Knol, H. van den Brand and B. Kemp (2013):
Piglet birth weight and litter uniformity: effects of weaning-to-pregnancy interval and body condition changes in sows of different parities and crossbred lines.
J. Anim. Sci. 91: 2099-2107. DOI: 10.2527/jas.2012-5659.
- Wilkinson, D. L., R. F. Bertolo, J. A. Brunton, A. K. Shoveller, P. B. Pencharz and R. O. Ball (2004):
Arginine synthesis is regulated by dietary arginine intake in the enterally fed neonatal piglet.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 287: E454-462. DOI: 10.1152/ajpendo.00342.2003.
- Windmueller, H. G. (1982):
Glutamine utilization by the small intestine.
In: Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology/Hrsg.: Alton Meister
53. Jahrgang:S 201-237.
New Jersey: John Wiley & Sons, Inc
Online ISBN:9780470122983
DOI: 10.1002/9780470122983.ch6.
- Windmueller, H. G. (1984):
Metabolism of Vascular and Luminal Glutamine by Intestinal Mucosa in Vivo.
In: Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues/ Hrsg.: D. Haussinger and H. Sies,
Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
ISBN 978-3-642-69754-8
- Wiyaporn, M., B. Thongsong and S. Kalandakanond-Thongsong (2013):
Growth and small intestine histomorphology of low and normal birth weight piglets during the early suckling period.
Livest. Sci. 158: 215-222. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.10.016.
- Wu, G. (2009):
Amino acids: metabolism, functions, and nutrition.
Amino Acids. 37: 1-17. DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0.
- Wu, G. (2010):
Functional amino acids in growth, reproduction, and health.
Adv Nutr. 1: 31-37. DOI: 10.3945/an.110.1008.

- Wu, G., F. W. Bazer, G. A. Johnson and Y. Hou (2018):
BOARD-INVITED REVIEW: Arginine nutrition and metabolism in growing, gestating, and lactating swine.
J. Anim. Sci. 96: 5035-5051. DOI: 10.1093/jas/sky377.
- Wu, G., F. W. Bazer, G. A. Johnson, D. A. Knabe, R. C. Burghardt, T. E. Spencer, X. L. Li and J. J. Wang (2011):
Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production.
J. Anim. Sci. S89: 2017-2030. DOI: 10.2527/jas.2010-3614.
- Wu, G., F. W. Bazer, J. M. Wallace and T. E. Spencer (2006):
Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences.
J. Anim. Sci. 84: 2316-2337. DOI: 10.2527/jas.2006-156.
- Wu, G. and D. A. Knabe (1994):
Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk.
J Nutr. 124: 415-424. DOI: 10.1093/jn/124.3.415.
- Wu, G., D. A. Knabe and S. W. Kim (2004):
Arginine nutrition in neonatal pigs.
J Nutr. 134: 2783S-2790S; discussion 2796S-2797S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2783S.
- Xi, P. B., Z. Y. Jiang, Z. L. Dai, X. L. Li, K. Yao, C. T. Zheng, Y. C. Lin, J. J. Wang and G. Y. Wu (2012):
Regulation of protein turnover by L-glutamine in porcine intestinal epithelial cells.
J Nutr Biochem. 23: 1012-1017. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.05.009.
- Xu, R. J., D. J. Mellor, M. J. Birtles, G. W. Reynolds and H. V. Simpson (1994):
Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 18: 231-240. DOI: 10.1097/00005176-199402000-00018.
- Xu, R. J., F. Wang and S. H. Zhang (2000):
Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors.
Livest. Prod. Sci. 66: 95-107. DOI: Doi 10.1016/S0301-6226(00)00217-7.

Yang, C., X. Yang, D. Lackeyram, T. C. Rideout, Z. Wang, B. Stoll, Y. Yin, D. G. Burrin and M. Z. Fan (2016a):

Expression of apical Na(+)-L-glutamine co-transport activity, B(0)-system neutral amino acid co-transporter (B(0)AT1) and angiotensin-converting enzyme 2 along the jejunal crypt-villus axis in young pigs fed a liquid formula.

Amino Acids 48: 1491-1508. DOI: 10.1007/s00726-016-2210-7.

Yang, X. F., Z. Y. Jiang, Y. L. Gong, C. T. Zheng, Y. J. Hu, L. Wang, L. Huang, X. Y. Ma and J. Plaizier (2016b):

Supplementation of pre-weaning diet with l-arginine has carry-over effect to improve intestinal development in young piglets.

Can. J. Anim. Sci. 96: 52-59. DOI: 10.1139/cjas-2015-0043.

Yang, X. F., J. F. Qin, L. Wang, K. G. Gao, C. T. Zheng, L. Huang and Z. Y. Jiang (2018):

Improved Milk Glutamine Level and Growth Performance of Suckling Piglets by Glutamine Supplementation in Maternal Diet.

Ann. Anim. Sci. 18: 441-452. DOI: 10.1515/aoas-2017-0040.

Yen, J., B. Kerr, R. Easter and A. Parkhurst (2004):

Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily.

J. Anim. Sci 82: 1079-1090. DOI: 10.2527/2004.8241079x.

Yi, D., Y. Hou, L. Wang, W. Ouyang, M. Long, D. Zhao, B. Ding, Y. Liu and G. Wu (2015):

L-Glutamine enhances enterocyte growth via activation of the mTOR signaling pathway independently of AMPK.

Amino Acids. 47: 65-78. DOI: 10.1007/s00726-014-1842-8.

Yonke, J. A., K. A. Seymour and S. W. El-Kadi (2023):

Branched-chain amino acid supplementation does not enhance lean tissue accretion in low birth weight neonatal pigs, despite lower Sestrin2 expression in skeletal muscle.

Amino Acids. DOI: 10.1007/s00726-023-03319-9.

Yoo, S. S., C. J. Field and M. I. McBurney (1997):

Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs.

J Nutr. 127: 2253-2259. DOI: 10.1093/jn/127.11.2253.

Zhang, B., H. Sun, Z. Sun, N. Liu, R. Liu and Q. Zhong (2023):

Glutamine alleviated heat stress-induced damage of porcine intestinal epithelium associated with the mitochondrial apoptosis pathway mediated by heat shock protein 70.

J. Anim. Sci 101: skad127. DOI: 10.1093/jas/skad127.

Zhang, J., Y. Yin, X. G. Shu, T. Li, F. Li, B. Tan, Z. Wu and G. Wu (2013):

Oral administration of MSG increases expression of glutamate receptors and transporters in the gastrointestinal tract of young piglets.

Amino Acids. 45: 1169-1177. DOI: 10.1007/s00726-013-1573-2.

Zhu, Y., W. Wang, T. Yuan, L. Fu, L. Zhou, G. Lin, S. Zhao, H. Zhou, G. Wu and J. Wang (2017):

MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 312: G434-G442. DOI: 10.1152/ajpgi.00020.2017

10. Anhang

10.1. Publikationsverzeichnis

10.1.1. Begutachtete Publikationen (peer reviewed publications)

Schregel, J., J. Schulze Holthausen, Q. L. Sciascia, S. Görs, Z. Li, A. Tuchscherer, E. Albrecht, J. Zentek and C. C. Metges (2024):

Acute and persistent effects of oral glutamine supplementation on growth, cellular proliferation, and tight junction protein transcript abundance in jejunal tissue of low and normal birthweight pre-weaning piglets.

Plos ONE 19: e0296427. DOI: 10.1371/journal.pone.0296427.

Schregel, J.; Schulze Holthausen, J.; Sciascia, Q. L.; Li, Z.; Görs, S.; Eggert, A.;

Tuchscherer, A.; Zentek, J.; Metges, C. C. (2022):

Effects of oral glutamine supplementation on jejunal morphology, development, and amino acid profiles in male low birth weight suckling piglets.

PLOS ONE 17(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0267357.

Li, Z., Q. L. Sciascia, S. Görs, N. Nguyen, F. Rayatdoost Baghal, **J. Schregel**, A. Tuchscherer, J. Zentek and C. C. Metges (2022):

Glutamine supplementation moderately affects growth, plasma metabolite and free amino acid patterns in neonatal low birthweight piglets.

British Journal of Nutrition 128(12): 2330-2340. DOI: 10.1017/S0007114522000459.

Schulze Holthausen, J., **Schregel, J.**, Sciascia, Q.L., Li, Z., Tuchscherer, A., Vahjen, W., Metges, C.C., Zentek, J., 2022:

Effects of Oral Glutamine Supplementation, Birthweight and Age on Colonic Morphology and Microbiome Development in Male Suckling Piglets.

Microorganisms 10, 1899.

Zhao, Y., E. Albrecht, Q. L. Sciascia, Z. Li, S. Görs, **J. Schregel**, C. C. Metges and S. Maak (2020):

Effects of Oral Glutamine Supplementation on Early Postnatal Muscle Morphology in Low and Normal Birth Weight Piglets.

Animals (Basel) 10. DOI: 10.3390/ani10111976.

Zhao, Y., E. Albrecht, Z. Li, **J. Schregel**, Q. L. Sciascia, C. C. Metges and S. Maak (2021): Distinct Roles of Perilipins in the Intramuscular Deposition of Lipids in Glutamine-Supplemented, Low-, and Normal-Birth-Weight Piglets.

Frontiers in Veterinary Science 8. DOI: 10.3389/fvets.2021.633898.

Zhao, Y., E. Albrecht, K. Stange, Z. Li, **J. Schregel**, Q. L. Sciascia, C. C. Metges and S. Maak (2021):

Glutamine supplementation stimulates cell proliferation in skeletal muscle and cultivated myogenic cells of low birth weight piglets.

Scientific Reports 11: 13432. DOI: 10.1038/s41598-021-92959-6.

10.1.2. Begutachtete Kurzfassungen (peer reviewed abstracts)

Li, Z., Q. L. Sciascia, **J. Schregel**, S. Goers, A. Tuchscherer and C. C. and Metges (2019): Effect of glutamine supplementation in the neonatal phase on growth of low birth weight piglets. EAAP Book of Abstracts.

Li Z., W. A., Sciascia Q.L., **Schregel J.**, Goers S., Tuchscherer A., Dusel G. and Metges C.C. (2021):

The effect of pre-weaning supplemental liquid feeding on piglet survival, growth, sows body condition and milk composition.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.

Q.L. Sciascia, Z. Li., **J. Schregel**, S. Görs and C.C. Metges (2019):

Plasma metabolites and amino acids in low and normal birth weight piglets at birth and 4 hours later.

EAAP Book of Abstracts.

Schregel, Q. L. Sciascia., Z. Li, C. C. Metges (2019):

Einfluss einer Glutamin Supplementierung bei neugeborenen Ferkeln mit niedrigem und normalem Geburtsgewicht auf Wachstum, sowie Proteinsyntheserate und biochemische Parameter im Jejunum.

Tagung Schweine- und Geflügelernährung 15: 50-52.

Schregel J., S. Q. L., Li Z., Metges C. C. (2020):

Effects of neonatal glutamine supplementation on the jejunal abundance of mRNA encoding for antioxidant defence enzymes, tight junction and glutaminase proteins in low birth weight piglets.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.

Schregel J., Sciascia. Q. L., Li Z., Metges C. C. (2021):

The effect of birth weight and age on jejunal tight junction mRNA abundance and cellular proliferation during the suckling period in male piglets.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.

Schulze Holthausen J., Sciascia. Q. L., **Schregel J.**, Li Z., Metges C. C., Zentek J. (2021):

Histomorphological development of the jejunum in low birth weight and normal birth weight piglets with or without glutamine supplementation during suckling period.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.

Schulze Holthausen J., S. Q. L., **Schregel J.**, Li Z., Metges C. C., Zentek J. (2021):

Influence of oral glutamine supplementation on piglet jejunal immunological parameters at the end of the suckling period.

25th Congress of the European College of Veterinary and Comparative Nutrition, Vila Real, Portugal.

Y. Zhao, E. A., Z. Li, **J. Schregel**, Q. Sciascia, C.C. Metges and S. Maak (2019a):

Birth weight and glutamine supplementation effects on early postnatal muscle development of piglets.

EAAP Book of Abstracts.

Y. Zhao, E. A., Z. Li, **J. Schregel**, Q. Sciascia, C.C. Metges and S. Maak (2020a):

Perilipins and the intramuscular lipid deposition in glutamine supplemented, low birth weight piglet.

EAAP Book of Abstracts.

Y. Zhao, E. A., Z. Li, **J. Schregel**, S. Görs, Q. Sciascia, C.C. Metges and S. Maak (2020b):

Glutamine supplementation stimulates cell proliferation in the muscle of low birth weight piglets.

EAAP Book of Abstracts.

Z. Li, A. W., Q. Sciascia, S. Goers, A. Tuchscherer, **J. Schregel**, G. Dusel and C.C. Metges (2020):

Supplemental liquid feeding of suckling piglets on growth, sow condition and milk composition. EAAP Book of Abstracts.

Schulze Holthausen, J.; Sciascia, Q.; **Schregel, J.**; Metges, C.C; Zentek, J. (2022):

Influence of oral glutamine supplementation on bacterial metabolites in stomach and jejunum in neonatal piglets.

76. digitale Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie – 08.03.-10.03.2022.

In: Society of Nutrition Physiology - Gesellschaft für Ernährungsphysiologie; (Hrsg.) DLG-Verlag; 31,104, ISBN: 978-3-7690-4115-6.

Schulze Holthausen, J.; Sciascia, Q. L.; **Schregel, J.**; Li, Z.; Andreotti, S.; Vahjen, W.; Metges, C. C.; Zentek, J. (2022):

The effect of glutamine supplementation, birth weight and age on the dominant microbiota in the jejunum of suckling piglets.

26th ESVCN Congress Basel – 06.09.-08.09.2022. In: Proceedings of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 167, ISBN: 978-3-033-09422-2.

Schulze Holthausen, J.; Sciascia, Q. L.; **Schregel, J.**; Li, Z.; Andreotti, S.; Vahjen, W.; Metges, C. C.; Zentek, J. (2022):

Der Einfluss von Glutaminergänzung, Geburtsgewicht und Alter auf die Mikrobiota mit geringer Abundanz im Magen und Jejunum von Saugferkeln.

DVG Kongress Berlin – 13.10.-15.10.2022.

Schulze Holthausen, J.; Sciascia, Q. L.; **Schregel, J.**; Andreotti, S.; Vahjen, W.; Metges, C.C.; Zentek, J. (2023):

Influence of oral glutamine supplementation on the abundance of gene expression and metabolic pathways in digesta of jejunum in neonatal piglets.

77.Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie Göttingen – 07.03.-09.03.2023.

In: Society of Nutrition Physiology - Gesellschaft für Ernährungsphysiologie; (Hrsg.) DLG-Verlag; 32, ISBN: 978-3-7690-4116-3.

10.2. Danksagung

Prof. Dr. Metges

An dieser Stelle möchte ich mich bei Ihnen bedanken, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben bei Ihnen promovieren zu dürfen. Die kontroversen, aber stets produktiven Diskussionen bereichern diese Arbeit aber auch mich in meiner Lebenserfahrung. Auch wenn ich das FBN schon seit mehreren Jahren verlassen habe, bin ich sehr dankbar für alle Fähigkeiten, die ich am Institut erlernen durfte.

Prof. Dr. Zentek

Ebenfalls möchte ich mich bei Ihnen für alle kontroversen aber auch zielführenden Diskussionen bedanken. Ich möchte Ihnen außerdem mein Dank dafür aussprechen, dass Sie mich bei meinem steinigen Weg zur Dissertation unterstützt haben.

Quentin L. Sciascia, PhD

Ohne dich hätte ich nie die Kraft gefunden diese Arbeit zu beenden. Die unzähligen Diskussionen, Korrekturen und Nachfragen haben die Vollendung dieser Promotionsschrift erst ermöglicht. Durch deine guten Erklärungen statistischer Sachverhalte wurde meine statistischen Kenntnisse nachhaltig positiv beeinflusst und mein Interesse nachträglich gefördert. Vielen Dank für deine Unterstützung.

Birgit Mielenz

Ich möchte mich ganz herzlich bei dir für deine Geduld beim Einarbeiten bedanken. Ohne dich wäre die Streuung in meinen Messungen noch höher und die Ergebnisse noch schwieriger zu diskutieren.

Verena Hofer-Pretz

Vielen Dank beim Einarbeiten im Labor und das schrittweise Erklären der PCR.

Ottavia Agrifolio

Vielen Dank für unsere gegenseitige Psychotherapie und die hunderten Tassen Espresso, die meine Arbeit belebt haben.

Dr. Franziska Koch

Vielen Dank für die zahlreichen hilfreichen Tipps bei der Durchführung der PCR und die unzähligen aufbauenden Worte.

Dr. Johannes Schulze Holthausen

Ganz besonders möchte ich mich bei dir bedanken. Auch wenn das Erstellen der Publikationen sehr viel Kraft gekostet hat, möchte ich diese Erfahrung nicht missen. Außerdem möchte ich mich bei dir für die vielen konstruktiven Korrekturvorschläge bedanken.

Juliane Buchallik

Ich möchte mich bei dir für deine unzähligen aufbauenden Worte bedanken. Deine Korrekturvorschläge haben mir sehr geholfen.

Dr. Matthias Wagner PhD, Frederik Kiene PhD, Dr. Saskia Neubert, Dr. Thies Nicolaisen, Dr. Alexandra von Altrock, Prof. Dr. Isabell Hennig-Pauka

Vielen Dank für die zahlreichen aufbauenden Worte und Ermutigungen, durch welche ich nicht den Spaß an der Wissenschaft verloren habe.

10.3. Finanzierungsquellen

Diese Studie wurde innerhalb eines Projektes der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) durchgeführt. Diese Arbeit wurde durch die folgenden Grants der Deutschen Forschungsgesellschaft unterstützt: Grant Nummer: ME 1420/10/-1, Grant Nummer: ZE 322/4-1. Zusätzlich wurde die Arbeit durch das FBN (Forschungsinstitut für Nutztierbiologie) unterstützt. Ich bestätige die Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgesellschaft.

10.4. Interessenkonflikt

Der Autor erklärt, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

10.5. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Arbeit wurde in dieser Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hannover, den 17.06.2024

Johannes Buchallik-Schregel



9 783967 292497
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-249-7