

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ
ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΤΟΥΣ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΔΕΛΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

Εξεταστική Επιτροπή:

Χάγερ-Θεοδορίδου Α. Επ. Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Γκολιομύτης Μ. Λέκτορας

Παππάς Α. Λέκτορας

Αθήνα, Ιανουάριος 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ
ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΤΟΥΣ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΔΕΛΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

Εξεταστική Επιτροπή:

Χάγερ-Θεοδορίδου Α. Επ. Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Γκολιομύτης Μ. Λέκτορας

Παππάς Α. Λέκτορας

Αθήνα, Ιανουάριος 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της Μεταπτυχιακής μου Μελέτης.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω την Κ. Χάγερ – Θεοδωρίδου Αριάδνη, Επίκουρο Καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου για την καθοδήγηση που μου προσέφερε, για τις επιστημονικές και πολύτιμες υποδείξεις της και για τη τιμητική για εμένα συνεργασία μαζί της. Σας είμαι ευγνώμων.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Κ. Γκολιομύτη Μιχάλη Λέκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και Κ. Παππά Αθανάσιο Λέκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμβολή τους και τις εποικοδομητικές τους συμβουλές σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Κ. Τσουρέκη Δήμητρα για τη βοήθειά της και την άριστη συνεργασία την οποία είχαμε σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

Τέλος, σημαίνουσα θέση στις ευχαριστίες δε θα μπορούσε παρά να κατέχει η οικογένειά μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την αμέριστη συμπαράσταση, την αγάπη αλλά και την ενθάρρυνσή τους σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	6
B	Abstract	8
Γ	Θεωρητικό Μέρος	9
1	Εισαγωγή	10
1.1	Αξία ζωικών προϊόντων	10
1.2	Οξείδωση λιπών στα ζωικά προϊόντα	11
1.3	Κατηγορίες αντιοξειδωτικών	12
1.4	Φλαβονοειδή	12
1.4.1.	Κερσετίνη	14
1.4.1.1	Αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών	14
1.4.1.2	Ανοσοτροποποιητική δράση των φλαβονοειδών	15
1.4.1.3	Βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών	16
1.5	Σκοπός της μελέτης	16
Δ	Πειραματικό Μέρος	18
2	Υλικά και μέθοδοι	19
2.1	Ζωικό υλικό	19
2.2	Συνθήκες εκτροφής	19
2.3	Διατροφή ορνιθίων	21
2.4	Προσδιορισμός σωματικού βάρους, κατανάλωσης τροφής, μέσου αθροιστικού συντελεστή μετατρεψιμότητας και	22

	θνησιμότητας των ορνιθίων	
2.5	Διαδικασία σφαγής	23
2.6	Δοκιμασία χορήγησης φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA)	23
2.7	Εμβολιασμός των ορνιθίων με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (Sheep Red Blood Cell - SRBC)	24
2.8	Μέτρηση του δείκτη βάρους του θύλακα <i>Fabricius</i>, του θύμου, και του σπλήνα - προσδιορισμός κυττάρων θύλακα <i>Fabricius</i>, θύμου	26
2.9	Στατιστική επεξεργασία	27
3	Αποτελέσματα	27
3.1	Σωματικό βάρος ορνιθίων	27
3.2	Κατανάλωση τροφής	29
3.3	Συντελεστής μετατρεψιμότητας	31
3.4	Καταγραφή θνησιμότητας ορνιθίων	32
3.5	Δοκιμή της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA)	33
3.6	Τιτλοδότηση των παραγόμενων ειδικών αντισωμάτων στα ορνίθια μετά από ανοσοποίηση με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (Sheep Red Blood Cell – SRBC)	34
3.7	Αριθμός κυττάρων του θύλακα <i>Fabricius</i> και του θύμου	37
3.8	Δείκτης βάρους θύλακα <i>Fabricius</i>, θύμου και σπλήνα	39
E	Συζήτηση	41
ΣΤ	Βιβλιογραφία	45

ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΤΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΔΕΛΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

*Τμήμα Ζωικής Επιστήμης και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής
Ζωοτεχνίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55, email: a.hager@aua.gr*

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται μελέτες για τη δράση της διαιτητικής χορήγησης φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή, ως φυσικά αντιοξειδωτικά, προτείνονται ως εναλλακτικά αντιοξειδωτικά πρόσθετα διατροφής στη ζωική παραγωγή. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η επίδραση του φλαβονοειδούς κερσετίνη στο ανοσοποιητικό σύστημα ορνιθίων και σε ορισμένες ζωοτεχνικές παραμέτρους τους.

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 150 ορνίθια κρεοπαραγωγής (υβρίδιο Cobb 500). Η εκτροφή διήρκεσε 51 ημέρες και τα ορνίθια υποβλήθηκαν σε 3 επεμβάσεις από την πρώτη ημέρα εκτροφής. Η κερσετίνη ενσωματώθηκε σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5 g/kg στην επέμβαση K₁ και 1 g/kg τροφής στην επέμβαση K₂) ενώ στην επέμβαση του μάρτυρα (M) το σιτηρέσιο δεν περιείχε κερσετίνη.

Στα πτηνά και των τριών επεμβάσεων ενεργοποιήθηκε κυτταρική ανοσία με τη δοκιμασία χορήγησης φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) και η χυμική ανοσία με ανοσοποίηση με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (*Sheep Red Blood Cells*, SRBC). Επιπρόσθετα μετρήθηκαν τα βάρη του θύλακα *Fabricious*, του θύμου, του σπλήνα και ο αριθμός κυττάρων του θύλακα *Fabricious* και του θύμου. Στη μελέτη εξετάστηκε και η επίδραση της κερσετίνης σε ζωοτεχνικές παραμέτρους (σωματικό βάρος των ορνιθίων, μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής και μετατρεψιμότητα της τροφής).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην επίδραση της κερσετίνης στη χυμική ανοσολογική απάντηση και στη δοκιμή της φυτοαιμαγλουτινίνης. Επίσης δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα βάρη του θύλακα *Fabricious*, του θύμου, του σπλήνα και στον αριθμό κυττάρων του θύλακα *Fabricious* και του θύμου. Όσον αφορά τη μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής και το μέσο αθροιστικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής οι διαφορές ήταν στατιστικώς μη σημαντικές. Τέλος παρατηρήθηκε ότι το φύλο επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά την παραγωγή IgG αντισωμάτων ($P < 0.05$) καθώς ο τίτλος των αντισωμάτων είναι υψηλότερος στα θηλυκά ορνίθια, σε όλες τις επεμβάσεις. Συμπερασματικά, η διαιτητική χορήγηση κερσετίνης υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δε βρέθηκε να έχει επίδραση (θετική ή αρνητική) στις παραμέτρους του ανοσοποιητικού συστήματος των ορνιθίων κρεοπαραγωγής που μελετήθηκαν.

Λέξεις κλειδιά: κερσετίνη, χυμική ανοσολογική απάντηση, φυτοαιμαγλουτινίνη, ορνίθια κρεοπαραγωγής

INCORPORATION OF QUERCETIN IN BROILERS' DIET: EFFECTS OF PARAMETERS OF THE IMMUNE SYSTEM

Abstract

In recent years many studies have investigated for the effect of dietary administration of flavonoids. Flavonoids, as natural antioxidants, are suggested as natural substitutes of antioxidant additives in animal production. The purpose of this study is to investigate the effect of quercetin on the immune system of broilers and on broiler's performance.

One hundred and fifty day-old broilers, of mixed gender (Cobb 500), were used. The duration of the experiment was 51 days. There were 3 dietary treatments namely control (C), group K₁ and group K₂. In the diet of groups K₁ and K₂ quercetin was added at 0.5 g/kg and 1g/kg respectively, while the diet of group M didn't contain quercetin.

The animals of all three groups were subjected to the test of phytohemagglutinin (PHA) to induce cellular immune response. Humoral immune response was induced by inoculation with sheep red blood cells (SRBC). Additionally, the weights of bursa, thymus, spleen and the number of cells in bursa and thymus, were measured. Furthermore, we investigated the effect of quercetin on broiler's performance i.e. on body weight, average daily food consumption and cumulative feed conversion.

According to the results, quercetin did not have any statistically significant effects on the humoral or cellular immune response as tested by the SRBC and PHA tests correspondingly. Moreover, there were no differences on bursa, thymus, spleen weight nor on number of cells in bursa and thymus. The average daily feed consumption and the average cumulative rate of feed conversion did not differ. Finally it was observed that gender affects statistically significantly the production of IgG antibodies ($P < 0.05$) and female broiler had higher number of antibodies than males, in all treatment. In conclusion, dietary administration of quercetin was not found to have effect (positive or negative) on parameters of the immune system of broilers.

Key words: quercetin, humoral immune response, phytohemagglutinin, broiler

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αξία ζωικών προϊόντων

Τα προϊόντα ζωικής προέλευσης θεωρούνται ιδιαίτερα θρεπτικά καθώς παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό πρωτεΐνες (μυοσφαιρίνη, μυογόνο – μείγμα ενζύμων που αποτελείται από υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του μυός –, αλβουμίνη, λεκιθίνη), βιταμίνες (A, B, C, D, E) και μέταλλα (Fe, Na, Ca, Mg). Ωστόσο η οξειδωση των λιπιδίων και η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι φυσικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε βιολογικά συστήματα και οδηγούν σε υποβάθμιση των ζωικών προϊόντων (Wilson *et al.*, 1976). Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικά μόρια που βρίσκονται με τη μορφή ενός ή περισσότερων ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Σχηματίζονται στο ζωικό οργανισμό είτε ως βασικός διαμεσολαβητής σε βιολογικές διεργασίες (φλεγμονώδεις αντιδράσεις), είτε ως υποπροϊόν που δεν έχει ρόλο στην ίδια τη διαδικασία (Magder, 2006).

Όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου. Εκτός από τα δραστικά είδη οξυγόνου υπάρχουν και τα νιτρικά είδη. Τα κυριότερα από τα δραστικά είδη οξυγόνου είναι η ρίζα σουπεροξειδίου (O_2^-), το οξυγόνο απλής κατάστασης (1O_2), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot), το όζον (O_3) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCL$). Στα νιτρικά είδη περιλαμβάνονται το μονοξειδίο του αζώτου (NO^\cdot) και το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^\cdot) (Kohen and Nyska, 2002).

Ένα από τα προϊόντα ζωικής προέλευσης είναι το κρέας. Είναι υψηλής θρεπτικής αξίας καθώς η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες (μυοσίνη, σφαιρίνη), βιταμίνες (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12}), ανόργανα στοιχεία (Fe, Na, Ca, Mg, K, Cl, P) και ιχνοστοιχεία (I, Cu, Al, Mn, Co) είναι μεγάλη. Η ποιότητά του επηρεάζεται από τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του μυός (τρυφερότητα, pH, χρώμα, συνεκτικότητα και νερό). Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κρέατος παίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και στο χρόνο της συντήρησής του. Ένας από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς που συμβάλλει στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων και ιδιαίτερα των προϊόντων του κρέατος είναι η οξειδωση των λιπών (Kanner, 1994).

Με τον όρο λιπίδιο αναφέρεται ένα πλήθος ετερογενών ουσιών (λίπη, λιποδιαλυτές βιταμίνες, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια) που έχουν την ικανότητα να διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες (βενζόλιο, χλωροφόρμιο, αιθέρας), αλλά όχι όμως και στο νερό (Διαμαντίδης, 1994). Τα λιπαρά οξέα (*fatty acids*, FAs), που περιλαμβάνονται σε τριγλυκερίδια ή φωσφολιπίδια αποτελούνται από αλυσίδες υδρογονανθράκων οι οποίες καταλήγουν σε μία καρβοξυλική ομάδα. Ανάλογα με την ανθρακική αλυσίδα τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (*saturated fatty acids*, SFAs) αν διαθέτουν μόνο απλούς δεσμούς στο μόριό τους και σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (*unsaturated fatty acids*, UFAs). Αν τα τελευταία διαθέτουν ένα διπλό δεσμό στο μόριό τους ονομάζονται μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (*monounsaturated fatty*

acids, MUFAs) και αν διαθέτουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς ονομάζονται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs). Ενώ πολλά από τα λιπαρά οξέα μπορούν να παραχθούν στο ζωικό οργανισμό, υπάρχει μία κατηγορία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που δεν συντίθενται από τον ζωικό οργανισμό, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (*essential fatty acids*, EFAs). Τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα (EFAs) χαρακτηρίζονται ως ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα. Η ομάδα των ω-3 λιπαρών οξέων βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως σε ιχθυέλαια και περιλαμβάνει το α-λινολενικό οξύ (ALA, C18:3). Η ομάδα των ω-6 λιπαρών οξέων περιλαμβάνει το λινελαϊκό οξύ (LA, C18:2) και το γ-λινολενικό οξύ (GLA, C18:3). Αυτά τα λιπαρά οξέα υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φυτικά έλαια (ηλιέλαιο, καλαμποκέλαιο, σογιέλαιο). Το λινελαϊκό και το α-λινολενικό οξύ αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (*long chain polyunsaturated fatty acid*, LC-PUFAs). Η σύνθεση αυτών των οξέων (LC-PUFAs) από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα πραγματοποιείται μόνο στα ζωικά κύτταρα και όχι στα φυτικά. Το λινελαϊκό οξύ (C18:2) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του γ-λινολενικού οξέος (18:3) και του αραχιδονικού οξέος (ARA, C20:4, ω-6). Επίσης το α-λινολενικό οξύ (C18:3) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του εικοσα-πενταεν-οϊκού-οξέως (EPA, C20:5, ω3) και του εικοσιδωα-εξα-εν-οϊκού οξέως (DHA, C22:6, ω6) (Ratledge and Wynn, 2006).

1.2 Οξείδωση λιπών στα ζωικά προϊόντα

Η οξείδωση των λιπών σε ζωικά προϊόντα έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητάς τους. Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση των λιπιδίων στους ιστούς των ζώων είναι το είδος, το φύλο, η ηλικία, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, το φως και η έκθεση σε O₂. Κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες μέσω της αφαίρεσης υδρογόνου (Young and McEneny, 2001). Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξειδώνονται από μόρια οξυγόνου έτσι ώστε να δημιουργηθούν ρίζες υπεροξυλιπιδίων. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με τις ρίζες υπεροξυλιπιδίων που έχουν δημιουργηθεί και την εξαγωγή υδρογόνου από άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα για τη δημιουργία περισσότερων ελεύθερων ριζών (Kahl and Hildebrandt, 1986). Υπάρχουν διάφορες ουσίες (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, ένζυμα) που προστατεύουν την κυτταρική δομή και λειτουργία από την οξείδωση. Ωστόσο οι ουσίες αυτές μπορεί να χάνονται κατά τη μεταποίηση, το χειρισμό ή την αποθήκευση των προϊόντων κρέατος. Για αυτό το λόγο, είναι αναγκαία η προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών (στο προϊόν ή στο σιτηρέσιο) που επιβραδύνουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων των προϊόντων του κρέατος με αποτέλεσμα τη διατήρηση της ποιότητάς τους και την παράταση της διάρκειας συντήρησής του (Gordon, 2001).

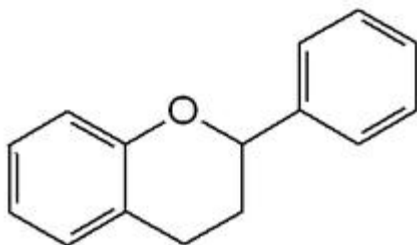
1.3 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας τον οργανισμό από την επιβλαβή δράση των τελευταίων. Για να αποφευχθεί η υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων και συγκεκριμένα του κρέατος χρησιμοποιούνται τόσο τα συνθετικά όσο και τα φυσικά αντιοξειδωτικά (Gordon, 2001).

Ορισμένα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA), το βουτυλικό υδροξυτολουόλιο (BHT) και η βουτυλοϋδροκινόνη (TBHQ) (Sarraga and Regueiro, 1999). Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά αν και συμβάλλουν στην επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων έχουν κατηγορηθεί για την πρόκληση σοβαρών προβλημάτων υγείας όπως διάφορες μορφές καρκίνου (Yanishlieva – Maslarova, 2001). Αυτή ήταν και η αιτία για να πραγματοποιηθούν πολλές μελέτες τις τελευταίες δεκαετίες με νέα φυσικά αντιοξειδωτικά ως εναλλακτική λύση απέναντι στα συνθετικά (Chen *et al.*, 1992, Pokorny, 2001). Τα περισσότερα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι φαινολικές ενώσεις και οι πιο σημαντικές ομάδες φυσικών αντιοξειδωτικών είναι οι τοκοφερόλες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή (Wenk, 2003).

1.4 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή (**Εικόνα 1**) αποτελούν μία ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο (Harbone and Williams, 2000). Η συγκεκριμένη ομάδα των πολυφαινολικών ενώσεων είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που συμμετέχουν στην αναπαραγωγή και την προστασία των φυτών από παθογόνους μικροοργανισμούς (Manach *et al.*, 2004). Υπάρχουν περισσότερες από 6.400 γνωστές ενώσεις φλαβονοειδών (Harbone and Williams, 2000). Τα φλαβονοειδή συμβάλλουν στη γεύση και στο χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Timberlake and Henry, 1986).



ΕΙΚΟΝΑ 1 Δομή των φλαβονοειδών (Nagendran *et al.*, 2006)

Η ομάδα των φλαβονοειδών παρουσιάζει διάφορες λειτουργίες τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Ορισμένες από τις δράσεις των πολυφαινολικών αυτών ενώσεων είναι η μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων, η πρόληψη του καρκίνου αναστέλλοντας την ανάπτυξη όγκου, η μείωση της απορρόφησης λίπους, η καταστολή της φλεγμονής, η μείωση ανάπτυξης καταρράκτη (Yang *et al.*, 2008) και η αναστολή της μολυσματικότητας των παθογόνων βακτηρίων (Friedman, 2007).

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται στις παρακάτω υποκατηγορίες:

- Φλαβανόνες
- Φλαβανόλες
- Φλαβόνες
- Φλαβονόλες

Τα φλαβονοειδή ανευρίσκονται σε όλα σχεδόν τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως τα μήλα, τα κρεμμύδια, το κόκκινο κρασί, τα σταφύλια, τα εσπεριδοειδή, το τσάι, τα μούρα και το ελαιόλαδο. Οι φλαβανόνες περιλαμβάνουν κυρίως εσπεριδίνη, ναρινγινίνη και ταξιφολίνη. Η κύρια πηγή όλων αυτών είναι τα εσπεριδοειδή. Οι φλαβόνες είναι λιγότερο συχνές και υπάρχουν κυρίως στο κόκκινο πιπέρι και στο σέλινο. Οι φλαβανόλες περιλαμβάνουν κυρίως κατεχίνες και περιέχονται στα φύλλα τσαγιού. Μεταξύ των φλαβονολών, η μυρικετίνη, η καμφερόλη και η κερσετίνη (**Πίνακας 1**) είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές (Serafini *et al.*, 2010).

Πίνακας 1 Συγκέντρωση κερσετίνης

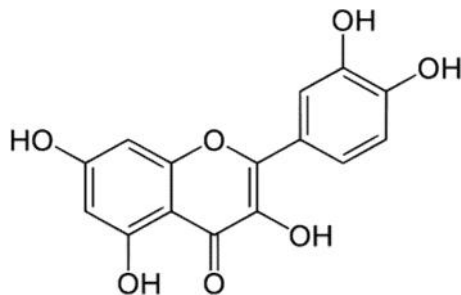
Πηγές	Συγκέντρωση (mg / 100g)
Τσάι πράσινο	255.5
Κάπαρη	180.7
Πιπεριά	27.6
Γύρη μελισσών	20.9
Γλυκοπατάτα	20.5
Κρεμμύδι	19.9
Σπανάκι	4.8

Μήλο	4.4
Σέλινο	3.5
Σταφύλι	3.5
Μπρόκολο	3.2
Φασόλια πράσινα	2.7
Βερίκοκο	2.5

Πηγή: USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods

1.4.1 Κερσετίνη

Η κερσετίνη (**Εικόνα 2**) θεωρείται ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό λόγω της ικανότητας που έχει να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες (Hollman and Katan, 1997).



ΕΙΚΟΝΑ 2 Δομή της κερσετίνης (Boots *et. al.*, 2008)

1.4.1.1 Αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών

Η κερσετίνη ως αντιοξειδωτικό αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Hollman and Katan, 1997, Sakanashi *et al.*, 2008). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό όπως καρδιαγγειακά νοσήματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Αυτές όμως μπορεί να καταπολεμηθούν από αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η κερσετίνη, η οποία παρεμβαίνει παρεμποδίζοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (Kahl and Hildebrandt, 1986, Balazs and Leon, 1994, Hollman and Katan, 1997). Σε πείραμα με ορνίθια (Tang *et al.*, 2001) όπου χορηγήθηκε στη διατροφή τους κατεχίνη (από φύλλα τσαγιού), διαπιστώθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μυϊκών ιστών στο μηρό και στο στήθος. Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε ύστερα από εννέα μήνες συντήρησης του σφάγιου στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Jiang *et al.*, 2007, καθώς μετά από χορήγηση ισοφλαβόνης σόγιας στη διατροφή των ορνιθίων η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν στατιστικώς

σημαντικά βελτιωμένη ($P < 0.01$) σε σχέση με αυτή των ορνιθίων που δε λάμβαναν ισοφλαβόνες. Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ορνίθια (Vasantha *et al.*, 2010), έδειξε ότι μετά από χορήγηση κερσετίνης στα ορνίθια δεν αυξήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος ή στους ιστούς του στήθους και του μηρού.

1.4.1.2 Ανοσοτροποποιητική δράση των φλαβονοειδών

Η κερσετίνη και άλλα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι έχουν και ανοσοτροποποιητική δράση και κυρίως αντιφλεγμονώδη. Η φλεγμονή είναι η αντίδραση των ιστών στους εισβολείς μικροοργανισμούς ή στην καταστροφή ιστού. Αποτελεί μια ζωτική προστατευτική διαδικασία διότι προκαλεί συνάθροιση αμυντικών κυττάρων στα σημεία της μικροβιακής εισβολής. Η φλεγμονή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση και κατευθυνόμενη μετανάστευση πολλών κυττάρων (μακροφάγων, ουδετερόφιλων) από την κυκλοφορία του αίματος στα σημεία εισβολής. Όμως οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορεί να έχουν βλαβερές επιπτώσεις στον οργανισμό, όπως στις περιπτώσεις της αυτοανοσίας και άλλων τύπων υπερευαισθησίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση είναι ωφέλιμες για τον οργανισμό (Tizard, 2004).

Σε διάφορα πειράματα έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή και συγκεκριμένα η κερσετίνη έχει αντιφλεγμονώδη δράση και αποτελεί αντικείμενο έρευνας για ένα ευρύ φάσμα από πιθανά οφέλη για την υγεία (Middleton and Kandaswami, 1986, Kandaswami and Middleton, 1994, Read, 1995, Middleton, 1998, Orsolich *et al.*, 2004, Stewart *et al.*, 2008, Mark Davis *et al.*, 2009). Τα φλαβονοειδή μειώνουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων κυττάρων από τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Συγκεκριμένα, η κερσετίνη εμποδίζει την παραγωγή ογκοκρωτικών παραγόντων τύπου α (TNF α) από μακροφάγα κύτταρα ενεργοποιημένα με λιποπολυσακχαρίτες (Manjeet and Ghosh, 1999). Επίσης, σε νευρογλοιακά κύτταρα η κερσετίνη ύστερα από ενεργοποίησή τους με LPS εμποδίζει την παραγωγή δύο προφλεγμονωδών κυτοκινών (TNF α και IL-1 α) (Bureau *et al.*, 2008). Οι συγκεκριμένες αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της κερσετίνης μπορεί να οφείλονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής. Τα δραστικά είδη οξυγόνου δεν εμπλέκονται μόνο στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες, αλλά και στην προώθηση των διεργασιών φλεγμονής μέσω ενεργοποίησης παραγόντων μεταφοράς (transfer factor) που προκαλούν την παραγωγή κυτοκινών (TNF α) (MacNee, 2001, Rahman, 2002). Ως εκ τούτου η καταπολέμηση των δραστικών ειδών οξυγόνου όχι μόνο συμβάλλει στην πρόληψη της εμφάνισης του οξειδωτικού στρες, αλλά συμβάλλει και στην άμβλυνση της φλεγμονής (Boots *et al.*, 2008).

1.4.1.3 Βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών

Οι ευεργετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών εξαρτώνται από τη βιοδιαθεσιμότητα τους (Parr and Bolwell, 2000, Walle, 2004). Ο όρος βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο μέρος της συνολικής προσληφθείσας ποσότητας ενός θρεπτικού συστατικού που χρησιμοποιείται για τις φυσιολογικές σωματικές λειτουργίες (Fairweather-Tait, 1999). Η βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών έχει αποδειχθεί ότι είναι διαφορετική από άτομο σε άτομο τόσο στους ανθρώπους όσο και στα πρωτεύοντα (Rafii *et al.*, 2003, 2004, Atkinson *et al.*, 2004). Τα φλαβονοειδή υπάρχουν στα τρόφιμα κυρίως ως γλυκοζίτες. Η απορρόφηση των φλαβονοειδών από τον οργανισμό δεν είναι εύκολη διότι κανένα ένζυμο δεν μπορεί να διασπάσει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αντίθετα οι αγλυκόνες, μη συζευγμένες μορφές, των φλαβονοειδών έχουν τη δυνατότητα να διαπεράσουν τα τοιχώματα του εντέρου, όμως τα φλαβονοειδή σπάνια εμφανίζονται στη φύση με τη μορφή των αγλυκονών. Το παχύ έντερο διαθέτει μικροοργανισμούς (εντεροβακτήρια) που μπορούν να υδρολύουν γλυκοζιτικούς δεσμούς ώστε να δημιουργηθεί η αγλυκόνη. Στη συνέχεια η αγλυκόνη απορροφάται εύκολα από τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου λόγω της λιποδιαλυτότητάς της και στη συνέχεια μεταβολίζεται στο ήπαρ. Οι γλυκοζίτες της κερσετίνης είναι σε θέση να διαπεράσουν το επιθηλιακό στρώμα των κυττάρων με μεγαλύτερη δυσκολία από ότι η αγλυκόνη της κερσετίνης. Με αυτόν τον τρόπο η υδρόλυση των γλυκοζιτών σε αγλυκόνες επιταχύνει την απορρόφηση της κερσετίνης (Murota and Terao 2003, Hollman *et al.*, 1997).

Οι Walle και οι συνεργάτες του (2000) πραγματοποιώντας πείραμα με ανθρώπους, διαπίστωσαν ότι οι γλυκοζίτες κερσετίνης υδρολύθηκαν ολοκληρωτικά σε αγλυκόνες πριν από την εντερική απορρόφηση. Από πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου (Vasanthan *et al.*, 2010), διαπιστώθηκε ότι οι γλυκοζίτες και οι αγλυκόνες κερσετίνης μπορούν να απορροφηθούν και να μεταβολιστούν από τον οργανισμό των ορνιθίων. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να διερευνηθεί η παρουσία κερσετίνης στους ιστούς και στα περιττώματα των πτηνών. Η διατροφή των ορνιθίων με κερσετίνη είχε διάρκεια 36 ημέρες και τα επίπεδα κερσετίνης ήταν 50, 150, 300 και 600 mg/kg σιτηρεσίου ανά ημέρα για διάστημα 4 ημερών (32^η - 36^η ημέρα). Μετά από τρεις ημέρες χορήγησης κερσετίνης διαπιστώθηκε η παρουσία της στο ήπαρ και στο δωδεκαδάκτυλο των πτηνών. Επίσης γλυκοζίτες και αγλυκόνες κερσετίνης εντοπίστηκαν στους μυϊκούς ιστούς του στήθους και του μηρού των ορνιθίων.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Είναι γεγονός ότι ο αριθμός των πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί με θέμα τις βιολογικές επιδράσεις των φλαβονοειδών είναι αρκετά υψηλός, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Τα φλαβονοειδή υπάρχουν σε πολλά φυτικά είδη και συμβάλλουν σε

σημαντικές λειτουργίες τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Η κερσετίνη ως ένα από τα πιο δραστικά φλαβονοειδή που υπάρχει σε φρούτα και λαχανικά προτείνεται ως φυσικό αντιοξειδωτικό στη ζωική παραγωγή. Η κερσετίνη έχειδειχθεί ότι έχει ανοσοτροποποιητική και συγκεκριμένα αντιφλεγμονώδη δράση στα τρωκτικά και στον άνθρωπο (Comalada *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2010). Μέχρι σήμερα δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που αφορούν την επίδραση της κερσετίνης στην ανοσοτροποποιητική δράση των ορνιθίων. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη θα εξεταστεί η επίδραση της κερσετίνης στο ανοσοποιητικό σύστημα ορνιθίων κρεοπαραγωγικού τύπου. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η ικανότητα αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος των ορνιθίων ύστερα από τη χορήγηση κερσετίνης σε δύο δοκιμασίες, τη χορήγηση φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) που διεγείρει την κυτταρική ανοσία και την ανοσοποίηση με ερυθρά κύτταρα προβάτου (SRBC) που διεγείρει τη χυμική ανοσία. Επιπρόσθετα θα μελετηθεί η ομοιόσταση των οργάνων του ανοσοποιητικού συστήματος των ορνιθίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ζωικό υλικό

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 150 αρσενικά και θηλυκά ορνίθια κρεοπαραγωγής (υβρίδιο Cobb 500). Η ηλικία των νεοσσών κατά την παραλαβή τους, από το εκκολαπτήριο Κούρκαφα (Κοριθία), ήτανε μίας ημέρας. Κατά την παραλαβή πραγματοποιήθηκε σήμανση των νεοσσών και μετρήθηκε το σωματικό τους βάρος.

Η συνολική διάρκεια εκτροφής ήτανε 51 ημέρες. Η εκτροφή των ορνιθίων ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2011 και ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του ίδιου έτους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του κτηνοτροφίου του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.2 Συνθήκες εκτροφής

Τα ορνίθια κατανεμήθηκαν τυχαία σε μία από τις 3 επεμβάσεις από την πρώτη ημέρα της εκτροφής τους. Η πρώτη αποτελούσε την επέμβαση του μάρτυρα (Μ), η δεύτερη την επέμβαση K_1 και η τρίτη την επέμβαση K_2 . Η κάθε επέμβαση περιελάμβανε 50 ορνίθια. Στα σιτηρέσια των επεμβάσεων K_1 και K_2 προστέθηκε κερσετίνη (βλέπε 2.3) σε αντίθεση με το σιτηρέσιο της επέμβασης Μ στο οποίο δεν ενσωματώθηκε κερσετίνη.

Η ανάπτυξη των ορνιθίων των τριών επεμβάσεων έγινε στις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος που ήταν ελεγχόμενες (θερμοκρασία, φωτισμός και αερισμός). Ο χώρος αυτός είχε καθαριστεί, απολυμανθεί και καλυφθεί με άχυρο σίτου πριν από την τοποθέτηση των νεοσσών. Οι νεοσσοί των 3 επεμβάσεων τοποθετήθηκαν σε 12 όμοια κελιά εμβαδού 2 m^2 . Η επέμβαση Μ χωρίστηκε σε 4 κελιά όπου τα 2 αποτελούνταν από 12 ορνίθια και τα άλλα 2 από 13 (**Σχήμα 2.2.1**). Το αντίστοιχο έγινε και με τα ορνίθια των επεμβάσεων K_1 και K_2 (βλέπε αναλυτική επεξήγηση των επεμβάσεων στο κεφάλαιο 2.3). Το κάθε κελί ήταν εξοπλισμένο με μία ταΐστρα, και με μία θερμομητέρα (λαμπτήρας υπέρυθρης ακτινοβολίας), ενώ όλα τα κελιά διέτρεχε γραμμικό σύστημα χορήγησης νερού με θήλαστρα (πιπίλες). Κατά την 1^η εβδομάδα της ζωής των ορνιθίων η τροφή και το νερό χορηγούνταν και σε συμπληρωματικές ταΐστρες και ποτίστρες νεοσσών. Οι θερμομητέρες αφαιρέθηκαν την 31^η ημέρα. Ο θάλαμος ήταν εξοπλισμένος με τεχνητό σύστημα αερισμού που ελεγχόταν από 2 θερμοστάτες στο ύψος των ορνιθίων. Καθημερινά γινόταν έλεγχος της μέγιστης και ελάχιστης θερμοκρασίας με αντίστοιχα θερμόμετρα στο ύψος των ορνιθίων. Η ρύθμιση της φωτοπερίόδου γινόταν αποκλειστικά με τεχνητό φως από λαμπτήρες κατά μήκος του θαλάμου. Σύμφωνα με τις ανάγκες των ορνιθίων, η θερμοκρασία την 1^η ημέρα στο θάλαμο ήταν 32°C . Στη συνέχεια μειωνόταν κατά 3°C ανά εβδομάδα έως την 4^η εβδομάδα οπότε η

θερμοκρασία ήταν 20°C. Μετά την 4^η εβδομάδα και έως το τέλος της εκτροφής η θερμοκρασία διατηρήθηκε μεταξύ 20-28°C.

Σχήμα 2.2.1 Σχεδιάγραμμα του θαλάμου εκτροφής

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
K ₂	K ₁	M	K ₂	K ₁	M	K ₂	K ₁	M	K ₂	K ₁	M
4 ^η ΟΜΑΔΑ			3 ^η ΟΜΑΔΑ			2 ^η ΟΜΑΔΑ			1 ^η ΟΜΑΔΑ		

Το πρόγραμμα φωτισμού (**Πίνακας 2.2.1**) εφαρμόστηκε σύμφωνα με τον οδηγό διαχείρισης της εταιρείας παραγωγής του υβριδίου (*Cobb Broiler Management Guide*). Το συγκεκριμένο πρόγραμμα φωτισμού (εναλλακτικό), εξασφαλίζει μειωμένη θνησιμότητα των ορνιθίων, λιγότερα προβλήματα των ποδιών, καλύτερη μετατρεψιμότητα της τροφής, βελτιώνει την πέψη με τα ενδιάμεσα διαστήματα ανάπαυσης, περιορίζει τον κανιβαλισμό και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα (έκκριση μελατονίνης).

Πίνακας 2.2.1 Πρόγραμμα φωτισμού

Ημέρες	Φως (ώρες)
0 - 6	24
7 - 21	15
22	16
23	17
24 - 37	18
38	19
39	20
40	22
41 - 51	23

Τα ορνίθια εμβολιάστηκαν για τις ασθένειες *Marek* και λοιμώδη βρογχίτιδα την 1^η ημέρα στο εκκολαπτήριο. Επίσης εμβολιάστηκαν για τις ασθένειες *Gumboro* (17^η ημέρα), ψευδοπανώλη και λοιμώδη βρογχίτιδα (24^η ημέρα.). Η χορήγηση των τριών εμβολίων πραγματοποιήθηκε με διάλυση του εκάστοτε εμβολίου στο πόσιμο νερό και αφού διακόπηκε η παροχή νερού για 2 ώρες πριν τη χορήγηση των εμβολίων. Επίσης χορηγήθηκε αντιβίωση (*Lamox* 800 mg/g) από την 30^η - 32^η ημέρα στο πόσιμο νερό διότι εκδηλώθηκε διάρροια. Από την εξέταση δείγματος κόπρου στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθήνας ταυτοποιήθηκαν οι μικροοργανισμοί *E. Coli* και *Proteus*. Εκτός από εμβόλια και αντιβίωση χορηγήθηκαν βιταμίνες (*Hiprachok-Amino*) από την 1^η - 4^η ημέρα και μετά τη χορήγηση των εμβολίων και της αντιβίωσης για 3 ημέρες. Η χορήγηση των βιταμινών έγινε με προσθήκη στο νερό.

2.3 Διατροφή ορνιθίων

Στο συγκεκριμένο πείραμα εφαρμόστηκε η μέθοδος της ομαδικής κατά βούληση διατροφής των ορνιθίων. Σε ολόκληρη τη διάρκεια της εκτροφής τα ορνίθια διατρέφονταν με συμπυκνωμένες ζωοτροφές υπό μορφή αλευρώδους μείγματος. Χρησιμοποιήθηκαν τρία σιτηρέσια για την κάλυψη των αναγκών τους, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξής τους. Το πρώτο σιτηρέσιο είναι το εναρκτήριο (0 - 9^η ημέρα), το δεύτερο σιτηρέσιο είναι το ανάπτυξης (10^η - 21^η ημέρα) και το τρίτο το τελικό σιτηρέσιο (22^η - 50^η ημέρα). Στο σιτηρέσιο της ομάδας K₁ προστέθηκε κερσετίνη σε συγκέντρωση 0.5 g/kg τροφής, ενώ στο σιτηρέσιο της ομάδας K₂ η κερσετίνη ήταν 1 g/kg τροφής. Η κερσετίνη (*Quercetin Dihydrate, MP Blomedicals, LLC*) ήταν υπό μορφή κίτρινης σκόνης. Για την ενσωμάτωση αυτής της ουσίας στο σιτηρέσιο παρασκευάστηκε ένα πρόμειγμα με αλεύρι και κερσετίνη και στη συνέχεια το πρόμειγμα αυτό ενσωματωνόταν στο σιτηρέσιο. Το σιτηρέσιο ανανεωνόταν ημερησίως και η κερσετίνη διατηρήθηκε στο ψυγείο σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής. Η σύνθεση και η χημική σύσταση (αναλυτική μέθοδος Weende) των σιτηρεσίων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2.3.1 Χημική σύσταση (%) και ενεργειακό περιεχόμενο (Mj/kg) σιτηρεσίων.

Χημική σύσταση	Εναρκτήριο	Ανάπτυξης	Τελικό
Ξηρά Ουσία	88,78	88,76	89,67
Μεταβολιστέα Ενέργεια (Υπολογισθείσα)	13.623	13.919	14.248
Αζωτούχες Ουσίες	22,68	20,80	19,34
Λιπαρές Ουσίες	3,65	4,19	5,32
Ινώδεις Ουσίες	2,58	2,32	2,54
Τέφρα	6,21	5,52	5,33

Πίνακας 2.3.2 Σύνθεση σιτηρεσίων (%).

Ζωοτροφή		Εναρκτήριο	Ανάπτυξης	Τελικό
Καρπός αραβοσίτου		55,78	62,93	65,61
Σογιάλευρο		33,61	26,36	22,95
Γλουτένη αραβοσίτου		5,00	5,00	5,00
Αλάτι		0,49	0,41	0,39
Λυσίνη		0,007	0,13	0,19
Μεθειονίνη		0,03	0,05	0,06
Μαρμαρόσκονη		1,61	1,56	1,47
Σογιέλαιο		1,54	1,69	2,57
Φωσφορικό. Μονασβέστιο		1,50	1,44	1,32
Ισορροπιστής†	Βιταμινών	0,20	0,20	0,20
	Ιχνοστοιχείων	0,20	0,20	0,20

†Κάθε kg ισορροπιστή-ιχνοστοιχείων περιείχε: Χλωριούχος χολίνη 200.000 mg, Co 125 mg, I 750 mg, Se 150 mg, Fe 25.000 mg, Mn 65.000 mg, Cu 10.000 mg, Zn 50.000mg.

Κάθε kg ισορροπιστή-βιταμινών περιείχε: Βιταμίνη A 6.000.000 Δ.Μ. ‡, Βιταμίνη D₃ 1.500.000 Δ.Μ., Βιταμίνη E 25.000 mg, Βιταμίνη K₃ 3.500 mg, Βιταμίνη B₁ 1.500 mg, Βιταμίνη B₂ 3.000 mg, Βιταμίνη B₆ 3.000 mg, Βιταμίνη B₁₂ 12,5 mg, Νικοτινικό οξύ 20.000 mg, Πανθοθενικό οξύ 6.000 mg, Φολικό οξύ 600 mg, Βιοτίνη 75mg.

‡ Διεθνείς Μονάδες

2.4 Προσδιορισμός σωματικού βάρους, κατανάλωσης τροφής, μέσου αθροιστικού συντελεστή μετατρεψιμότητας και θνησιμότητας ορνιθίων

Κατά τη διάρκεια της εκτροφής τα ορνίθια ζυγίζονταν εβδομαδιαίως. Η κατανάλωση της τροφής προσδιοριζόταν σε ημερήσια βάση για κάθε κελί. Επίσης ο μέσος αθροιστικός συντελεστής μετατρεψιμότητας υπολογιζόταν σε εβδομαδιαία βάση και προέκυπτε από το λόγο της κατανάλωσης τροφής προς το σωματικό βάρος των ορνιθίων. Τέλος καταγράφηκε η θνησιμότητα των ορνιθίων σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

2.5 Διαδικασία σφαγής

Την 50^η ημέρα του πειράματος τα ορνίθια υποβλήθηκαν σε νηστεία για 12 ώρες πριν από τη σφαγή. Την 51^η ημέρα πριν από τη σφαγή καταγράφηκε το ζων βάρος του κάθε πτηνού και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτρική αναισθητοποίηση. Κατόπιν, τα ορνίθια υποβλήθηκαν σε αποκοπή της κεφαλής, αφαίμαξη, εμβάπτιση σε νερό θερμοκρασίας 55°C, αποπύλωση και εκσπλαχνισμό. Αφαιρέθηκαν ο δεύτερος δεξιός λοβός του θύμου, ο θύλακας *Fabricious* και ο σπλήνας. Τα όργανα αυτά ζυγίστηκαν ξεχωριστά και διατηρήθηκαν σε πάγο.

2.6 Δοκιμασία χορήγησης φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA)

Πειράματα που πραγματοποιούνται σε ζώντες οργανισμούς (*in vivo*) μετρούν την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα που εφαρμόζονται από ερευνητές. Στην ανοσοτοξικολογία των πτηνών η πιο συνηθισμένη *in vivo* δοκιμή για την εκτίμηση της κυτταρικής ανοσίας είναι αυτή της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) (Fairbrother *et al.*, 2004). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι μία λεκτίνη που προέρχεται από το φυτό *Phaseolus vulgaris*. Οι λεκτίνες όταν συνδέονται με γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας σηματοδοτούν τη διαίρεση των λεμφοκυττάρων. Συνδέονται με σάκχαρα στις γλυκοπρωτεΐνες και συγκεκριμένα η φυτοαιμαγλουτινίνη συνδέεται με τη Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Όταν η PHA εισέρχεται στο δέρμα διεγείρονται τα Τ κύτταρα, πολλαπλασιάζονται, παράγουν κυτοκίνες με αποτέλεσμα την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης (Stadecker *et al.*, 1977, Lochmiller *et al.*, 1993, Tizard, 2004).

Την 15^η ημέρα της εκτροφής πραγματοποιήθηκε στα ορνίθια η δοκιμή της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) (Lavoie and Grasman, 2007). Με τη συγκεκριμένη δοκιμασία προκλήθηκε τοπική φλεγμονή στη διαδακτύλια μεμβράνη. Αρχικά επιλέχθηκαν τυχαία 4 ορνίθια από κάθε κελί, 16 ορνίθια συνολικά ανά επέμβαση. Σε κάθε πτηνό μετρήθηκε το πάχος της περιοχής ανάμεσα στο τρίτο και στο τέταρτο δάκτυλο με παχύμετρο σκανδάλης (OZAKI MG. CO., LTD, TOKYO, JAPAN) ακρίβειας 0,01 mm. Η μέτρηση αυτή έγινε και στα δύο πόδια της κάθε όρνιθας. Στη συνέχεια στο αριστερό πόδι κάθε πτηνού έγινε ένεση με διάλυμα που περιείχε PHA στη διαδακτύλια μεμβράνη και συγκεκριμένα ανάμεσα στο τρίτο και στο τέταρτο δάκτυλο κάθε όρνιθας. Η ποσότητα του διαλύματος της PHA (λεκτίνη, PHA-P, από *Phaseolus vulgaris*, Sigma L1668) που χορηγήθηκε ήταν 30μl/πτηνό, συγκέντρωσης 3333μg PHA/ml διαλύματος (100μg PHA/πτηνό). Για την παρασκευή του διαλύματος της φυτοαιμαγλουτινίνης, 5mg PHA διαλύθηκαν σε 1,5ml αποστειρωμένου PBS (*Phosphate Buffered Saline*) και η τελική συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 3333μg PHA/ml. Ταυτόχρονα στο δεξί πόδι των πτηνών, ανάμεσα στο τρίτο και στο τέταρτο δάκτυλο έγινε ένεση με αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα (PBS). Η ένεση με απλό διαλύτη (PBS) είναι επέμβαση μάρτυρα για να ξεχωρίσουμε την επίδραση του διαλύτη από την επίδραση της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA).

Την επόμενη ημέρα (μετά από 24±2 ώρες) μετρήθηκε ξανά το πάχος στο ίδιο σημείο της μεμβράνης που είχαν μετρηθεί πριν τις ενέσεις για να διαπιστωθεί αν δημιουργήθηκε τοπικό οίδημα και να υπολογιστεί ο δείκτης φλεγμονής.

Ο δείκτης φλεγμονής (δ.φ.) υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$\Delta.\Phi.=(\alpha-\beta) - (\gamma-\delta)$$

Όπου:

α = το πάχος του αριστερού ποδιού μετά την επέμβαση

β = το πάχος του αριστερού ποδιού πριν την επέμβαση

γ = το πάχος του δεξιού ποδιού μετά την επέμβαση

δ = το πάχος του δεξιού ποδιού πριν την επέμβαση

Πρακτικά ο δείκτης φλεγμονής είναι ένα μέτρο της τοπικής αντίδρασης που προκάλεσε η έγχυση φυτοαιμαγλουτινίνης.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και την 48^η ημέρα στα ίδια ορνίθια. Αυτή τη φορά οι ενέσεις έγιναν στη διαδακτύλια μεμβράνη ανάμεσα στο δεύτερο και τρίτο δάκτυλο κάθε ορνιθίου. Η ποσότητα διαλύματος της PHA ήταν 5 φορές μικρότερη, δηλαδή ενέθηκαν 30μl/πτηνό συγκέντρωσης 667μg/ml και η συνολική ποσότητα του PHA ήταν 20μg/πτηνό.

2.7 Εμβολιασμός των ορνιθίων με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (Sheep Red Blood Cell – SRBC)

Η δοκιμή της πρόκλησης χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης κατά ερυθροκυττάρων προβάτου χρησιμοποιείται ευρέως στην ανοσοτοξικολογία. Η ανοσολογική απάντηση από τα B κύτταρα κατά ορισμένων αντιγόνων (ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτων) απαιτούν την παρουσία των T βοηθητικών κυττάρων. Περίπου 2-3 ημέρες μετά το εμβολιασμό με αντιγόνο τα B λεμφοκύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν αντισώματα κατά του αντιγόνου στο πλάσμα του αίματος (Fairbrother *et al.*, 2004).

Την 21^η ημέρα του πειράματος οι όρνιθες εμβολιάστηκαν με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου. Ο εμβολιασμός έγινε σε 4 ορνίθια από κάθε κελί, 16 ανά επέμβαση. Η επιλογή των πτηνών ήταν τυχαία. Μετά από 6 ημέρες, την 27^η ημέρα, έγινε αιμοληψία από όλα τα εμβολιασμένα ορνίθια για να ποσοτικοποιηθεί η παραγωγή αντισωμάτων στο πλάσμα του αίματος. Η παρουσία αντισωμάτων στο πλάσμα του αίματος ανιχνεύεται με τη μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιείται συγκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων από αντισώματα. Τα

αντισώματα που παίρνουν μέρος στην αντίδραση της αιμοσυγκόλλησης είναι τα IgG και τα IgM, καθώς στο πλάσμα του αίματος υπάρχουν μόνο τα συγκεκριμένα αντισώματα. Η ανοσοποίηση και η τιτλοποίηση των αντισωμάτων έγινε σύμφωνα με τους (Lavoie and Grasman, 2007).

Η διαδικασία για τον εμβολιασμό των ορνιθίων ήταν ως εξής:

- 1ml SRBC συγκέντρωσης 9% διαλυμένο σε διάλυμα συντήρησης (Alsever's) φυγοκεντρήθηκε στα $340 \times g$ για πέντε λεπτά.
- Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλύθηκαν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε συνολικό όγκο 9ml PBS για τη δημιουργία αιωρήματος SRBC συγκέντρωσης 1%.

Τα ορνίθια εμβολιάστηκαν με 100μl 1% SRBC σε PBS με σύριγγα 0,5 ml και βελόνα 30Gauge \times 8mm, στη βραχιόνια φλέβα.

Αιμοληψία από τα ορνίθια:

- Λήψη 0,3 ml αίματος από τη βραχιόνια φλέβα, με σύριγγα ινσουλίνης 0,3 ml με βελόνα 30Gauge \times 8mm.
- Μεταφορά αίματος σε σωληνάκι με 10μl 10% αντιπηκτικού (E.D.T.A.).

Απομόνωση πλάσματος:

- Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε όρθια στάση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα $880 \times g$ για 20 λεπτά.
- Το υπερκείμενο (πλάσμα) μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάκι.
- Ακολούθησε επώαση στους 56°C για 30'.
- Το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους -20°C .

Τιτλοδότηση συνολικού αντισώματος (IgG και IgM):

- Σε μικροπλάκες 96 θέσεων σχήματος U, προστέθηκαν 25μl PBS σε όλες τις θέσεις.
- Το πλάσμα αίματος αποψύχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα $800 \times g$ για 1 λεπτό.
- Στην πρώτη θέση κάθε σειράς, 25μl πλάσματος αναμείχθηκαν με το PBS.
- Από το μείγμα, 25μl μεταφέρθηκαν στην επόμενη θέση και αναμείχθηκαν με το PBS. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και στις 12 θέσεις κάθε σειράς, ώστε να δημιουργηθεί διαδοχική και δυαδική αραιώση (1:2) του πλάσματος. Στο τέλος της διαδικασίας κάθε θέση περιελάμβανε 25μl αραιωμένου πλάσματος συγκέντρωσης 1:2 έως 1:12¹² συγκριτικά με το αδιάλυτο πλάσμα.

- Στη συνέχεια προστέθηκαν 25μl SRBC ίδιου αιματοκρίτη με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των ορνιθίων (1% SRBC).
- Οι μικροπλάκες επώαστηκαν στους 37 °C για μία ώρα.
- Μετά την επώαση για κάθε δείγμα πλάσματος σημειώθηκε η μεγαλύτερη αραιώση στην οποία παρατηρήθηκε αιμοσυγκόλληση. Ο τίτλος αντισωμάτων του πλάσματος υπολογίστηκε ως ο λογάριθμος με βάση το 2 του συντελεστή αραιώσης. Για παράδειγμα εάν η μεγαλύτερη αραιώση στην οποία παρατηρήθηκε αιμοσυγκόλληση ήταν 1:2⁸ τότε ο τίτλος ήταν $\log_2 2^8 = 8$.

Τιτλοδότηση αντισωμάτων IgG:

- Σε μικροπλάκες 96 θέσεων σχήματος U, προστέθηκαν 25μl πλάσματος και 25μl μερκαπτοαιθανόλης (2-ME) αραιωμένη σε PBS, μόνο στις θέσεις της πρώτης σειράς. Οι μικροπλάκες αυτές επώαστηκαν στους 37 °C για μία ώρα.
- Μετά τη επώαση προστέθηκαν 25μl PBS σε όλα τις θέσεις εκτός από αυτά της πρώτης σειράς.
- Στη συνέχεια επαναλήφθηκε η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

Η τιτλοδότηση όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

Ο υπολογισμός των IgM αντισωμάτων έγινε με αφαίρεση του τίτλου των IgG αντισωμάτων από τον τίτλο του συνολικού αντισώματος (IgG και IgM).

2.8 Μέτρηση του δείκτη βάρους του θύλακα *Fabricius*, του θύμου, και του σπλήνα - προσδιορισμός κυττάρων θύλακα *Fabricius*, θύμου

Αμέσως μετά τη σφαγή των ορνιθίων μετρήθηκαν οι δείκτες για το βάρος του σπλήνα, του θύλακα *Fabricius* (Μπούρσα) και του δεύτερου δεξιού λοβού του θύμου (4 ορνίθια/κελί). Ως δείκτης ορίζεται το πηλίκο του βάρους κάθε οργάνου προς το αντίστοιχο ζων βάρος. Επιπρόσθετα προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων της μπούρσας (6 ορνίθια/επέμβαση, 1-2 ορνίθια / κελί) και του θύμου (12 ορνίθια/επέμβαση, 4 ορνίθια/κελί). Η μέτρηση των κυττάρων του θύλακα και του θύμου έγινε στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου (Neubauer). Τα κύτταρα μετρήθηκαν σε 1 από τα 25 τετραγωνίδια του αιματοκυτταρόμετρου. Για να βρεθεί η συγκέντρωση (κύτταρα/ml) του αιωρήματος των κυττάρων πολλαπλασιάστηκε ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκαν στο 1 τετραγωνίδιο με το γινόμενο 25×10^4 . Για να βρεθεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων του κάθε οργάνου πολλαπλασιάστηκε η συγκέντρωση του αιωρήματος επί το συνολικό όγκο.

2.9 Στατιστική επεξεργασία

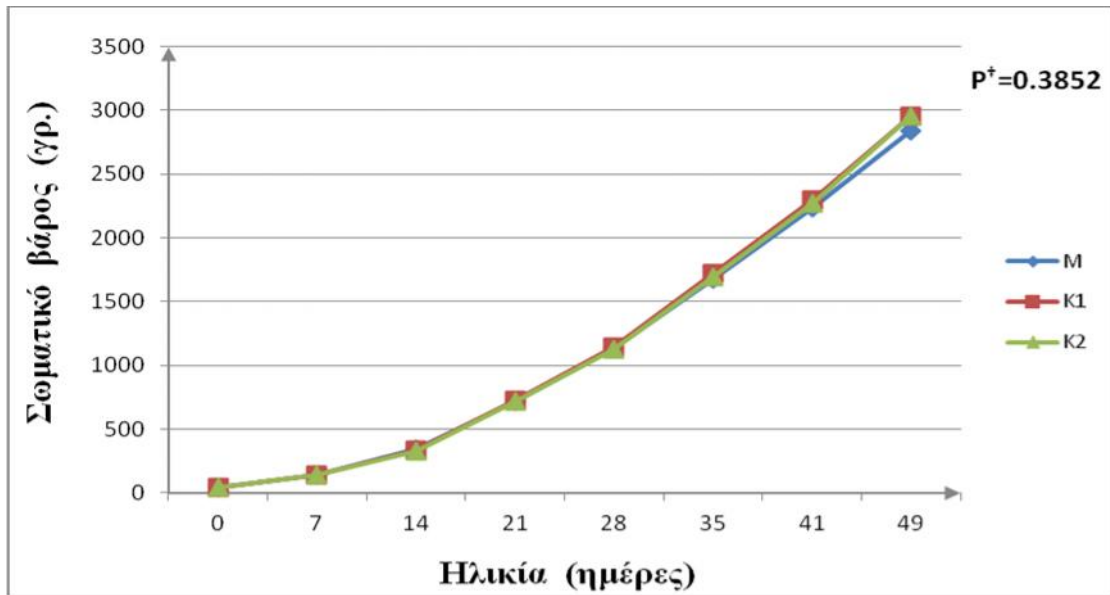
Ο πειραματικός σχεδιασμός έγινε σύμφωνα με το σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων (*Randomized Block Design*). Ο θάλαμος εκτροφής διαιρέθηκε σε 4 συνεχόμενες ομάδες κελιών (*blocks*) σε καθεμία από τις οποίες απαντώνται και οι 3 επεμβάσεις (M, K₁, K₂) (**Σχήμα 2.2.1**). Κατά συνέπεια κάθε επέμβαση κατανεμήθηκε σε 4 κελιά – επαναλήψεις. Το σωματικό βάρος, ο μέσος αθροιστικός συντελεστής μετατρεψιμότητας και η ημερήσια κατανάλωση τροφής των ορνιθίων αναλύθηκαν με το Μεικτό Γραμμικό Πρότυπο με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με ανεξάρτητες μεταβλητές το επίπεδο χορήγησης κερσετίνης, την ηλικία, την ομάδα κελιών (*block*) και την αλληλεπίδραση ηλικίας και επέμβασης. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα *PROCEDURE MIXED* του στατιστικού πακέτου SAS (2002).

Τα δεδομένα των αναλύσεων που αφορούν τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά (ο δείκτης φλεγμονής στη χορήγηση PHA, ο συνολικός τίτλος αντισωμάτων καθώς και των IgG και IgM στα ερυθροκύτταρα προβάτου, ο δείκτης βάρους για το θύλακα του *Fabricious*, το θύμο και το σπλήνα, ο αριθμός κυττάρων του θύλακα του *Fabricious* και του θύμου) επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (13.0). Ο δείκτης φλεγμονής στη χορήγηση PHA, ο αριθμός κυττάρων του θύλακα του *Fabricious* και του θύμου, ο δείκτης βάρους για το θύλακα του *Fabricious*, το θύμου και το σπλήνα, ο συνολικός τίτλος αντισωμάτων και ο τίτλος των IgM αντισωμάτων (εξαρτημένες μεταβλητές) αναλύθηκαν σύμφωνα με ένα Γενικό Γραμμικό Πρότυπο (*GLM-General Linear Model*) χρησιμοποιώντας σαν ανεξάρτητες μεταβλητές την επέμβαση, το φύλο, το ζων βάρος και το κελί των ορνιθίων. Ο τίτλος των αντισωμάτων IgG (εξαρτημένη μεταβλητή) αναλύθηκε με ένα γενικευμένο γραμμικό πρότυπο (*Generalized Linear Model*) χρησιμοποιώντας και εδώ σαν ανεξάρτητες μεταβλητές την επέμβαση, το φύλο, το ζων βάρος και το κελί των ορνιθίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (M.O. \pm T.Σ.).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

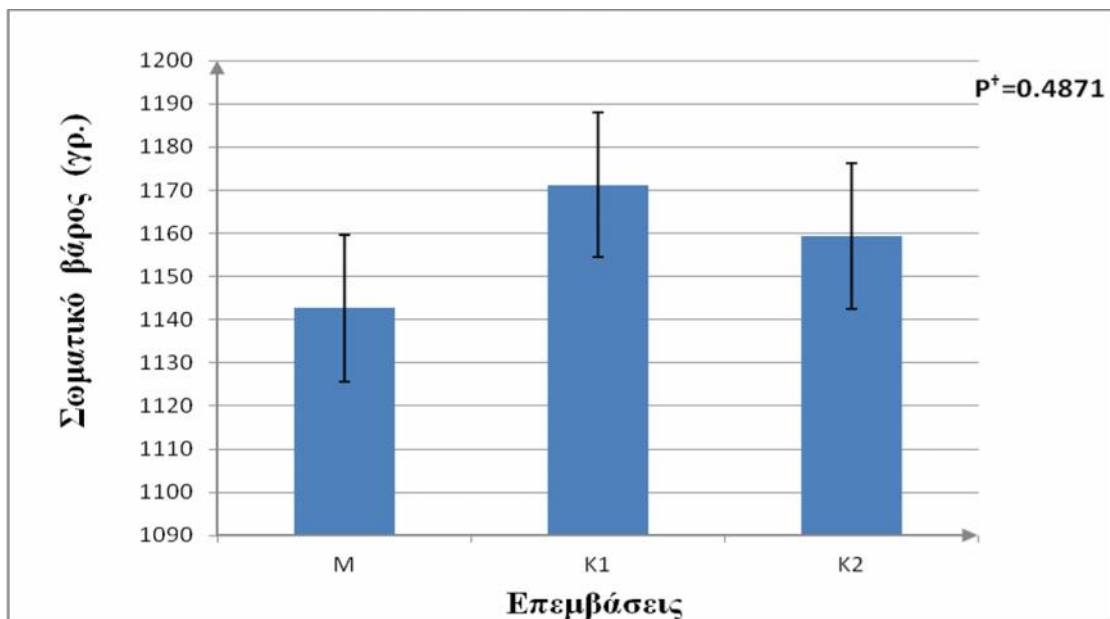
3.1 Σωματικό βάρος ορνιθίων

Κατά τη διάρκεια εκτροφής των ορνιθίων υπολογιζόταν ο μέσος όρος ελαχίστων τετραγώνων (M.O.E.T.) και το τυπικό σφάλμα (T.Σ.) του βάρους τους σε γραμμάρια ανά εβδομάδα. Από το **διάγραμμα 3.1.1** διαπιστώνεται ότι καθώς αυξάνεται η ηλικία των ορνιθίων αυξάνεται και το σωματικό τους βάρος και στις τρεις επεμβάσεις (M, K₁ και K₂). Ο ρυθμός του σωματικού βάρους αυξάνεται κυρίως τις ημέρες 14, 21, 28, 35, 41 και 49. Ωστόσο δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα σωματικά βάρη μεταξύ των επεμβάσεων ($P > 0.05$) (**Πίνακας 3.1**). Ο M.O.E.T. του σωματικού βάρους των ορνιθίων στη συνολική περίοδο εκτροφής δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών επεμβάσεων (**διάγραμμα 3.1.2**), όμως τα πτηνά της επέμβασης K₁ ήταν κατά μέσο όρο βαρύτερα και ακολουθούν τα πτηνά των επεμβάσεων K₂ και M αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.1.1 Εξέλιξη του σωματικού βάρους στη διάρκεια της εκτροφής στις τρεις επεμβάσεις (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων±Τυπικό Σφάλμα).

† Το επίπεδο σημαντικότητας για την αλληλεπίδραση ηλικίας-επέμβασης με κερσετίνη ήταν $P=0.3852$.



Διάγραμμα 3.1.2 Μέσο σωματικό βάρος ορνιθίων στις τρεις επεμβάσεις για τη συνολική περίοδο εκτροφής (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων ± Τυπικό Σφάλμα.).

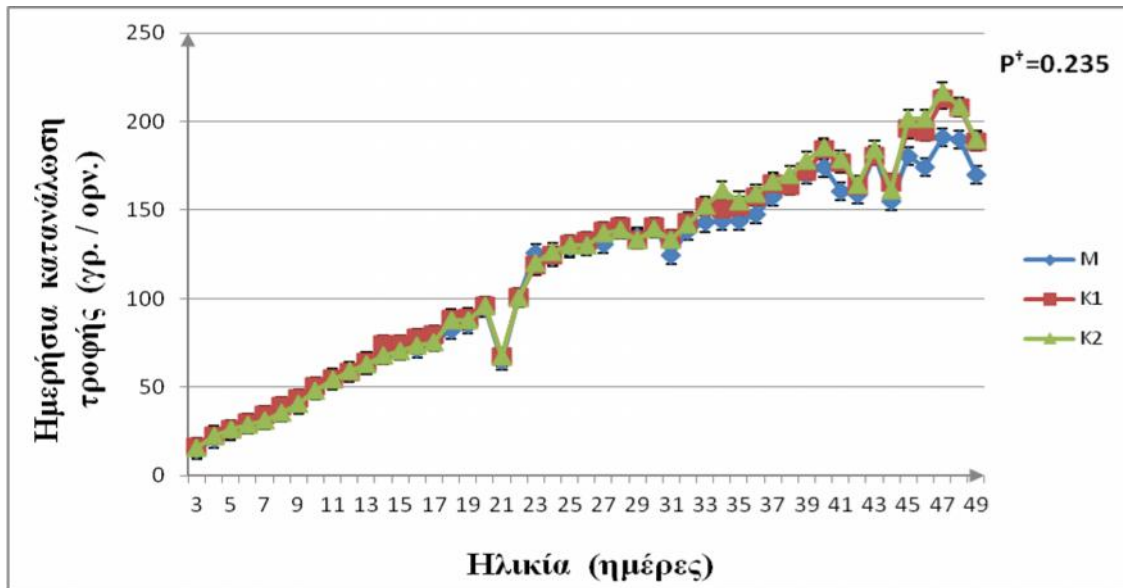
† Το επίπεδο σημαντικότητας για την επίδραση της επέμβασης με κερσετίνη στο σωματικό βάρος σε όλη τη διάρκεια του πειράματος με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ήταν $P=0.4871$.

Πίνακας 3.1 Εξέλιξη του σωματικού βάρους στη διάρκεια της εκτροφής στις τρεις επεμβάσεις (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων±Τυπικό Σφάλμα).

Ημέρες	Επέμβαση Μ	Επέμβαση Κ ₁	Επέμβαση Κ ₂
0	42.77 ± 24.75	43.24 ± 24.75	43.14 ± 24.75
7	143.44 ± 25.19	142.61 ± 24.75	140.57 ± 24.75
14	341.68 ± 25.41	336.98 ± 25.16	328.26 ± 25.16
21	722.64 ± 25.62	730.71 ± 25.16	717.67 ± 25.16
28	1135.94 ± 25.62	1148 ± 25.16	1124.65 ± 25.16
35	1677.09 ± 25.62	1718.4 ± 25.16	1695 ± 25.16
41	2235.96 ± 25.62	2296.61 ± 25.16	2271 ± 25.16
49	2841.55 ± 30.11	2953.19 ± 28.93	2953.72 ± 29.28

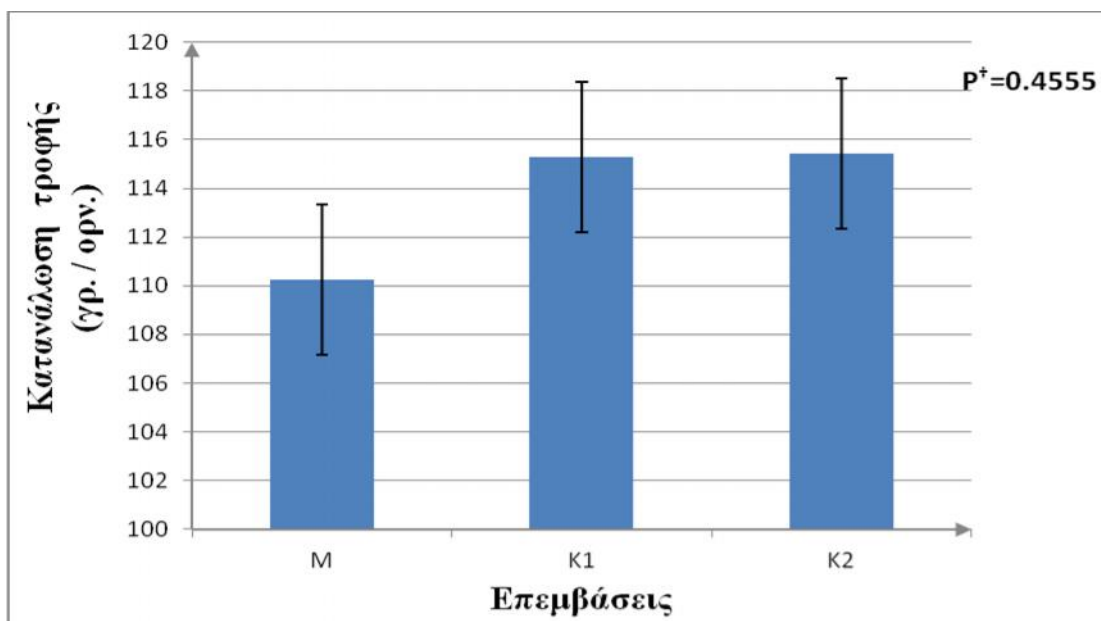
3.2 Κατανάλωση τροφής

Στο **διάγραμμα 3.2.1** παρουσιάζεται ο μέσος όρος ελαχίστων τετραγώνων (Μ.Ο.Ε.Τ.) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) της κατανάλωσης τροφής των ορνιθίων σε γραμμάρια ανά ημέρα. Σύμφωνα με το διάγραμμα η κατανάλωση τροφής αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εκτροφής και για τις τρεις επεμβάσεις (Μ, Κ₁ και Κ₂). Από το **διάγραμμα 3.2.2** φαίνεται ότι η μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής των ορνιθίων είναι μεγαλύτερη στην επέμβαση Κ₂, στη συνέχεια στην επέμβαση Κ₁ και τέλος στην επέμβαση Μ. Όμως οι επεμβάσεις δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση τροφής (P>0.05). Η πτώση της κατανάλωσης τροφής την 21^η ημέρα αποδίδεται σε λοίμωξη του πεπτικού που εκδηλώθηκε με διάρροια (βλέπε κεφάλαιο 2.2).



Διάγραμμα 3.2.1 Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ορνίθιο στις τρεις επεμβάσεις (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων±Τυπικό Σφάλμα)

† Το επίπεδο σημαντικότητας για την αλληλεπίδραση ηλικίας-επέμβασης με κερσετίνη ήταν $P=0.235$.

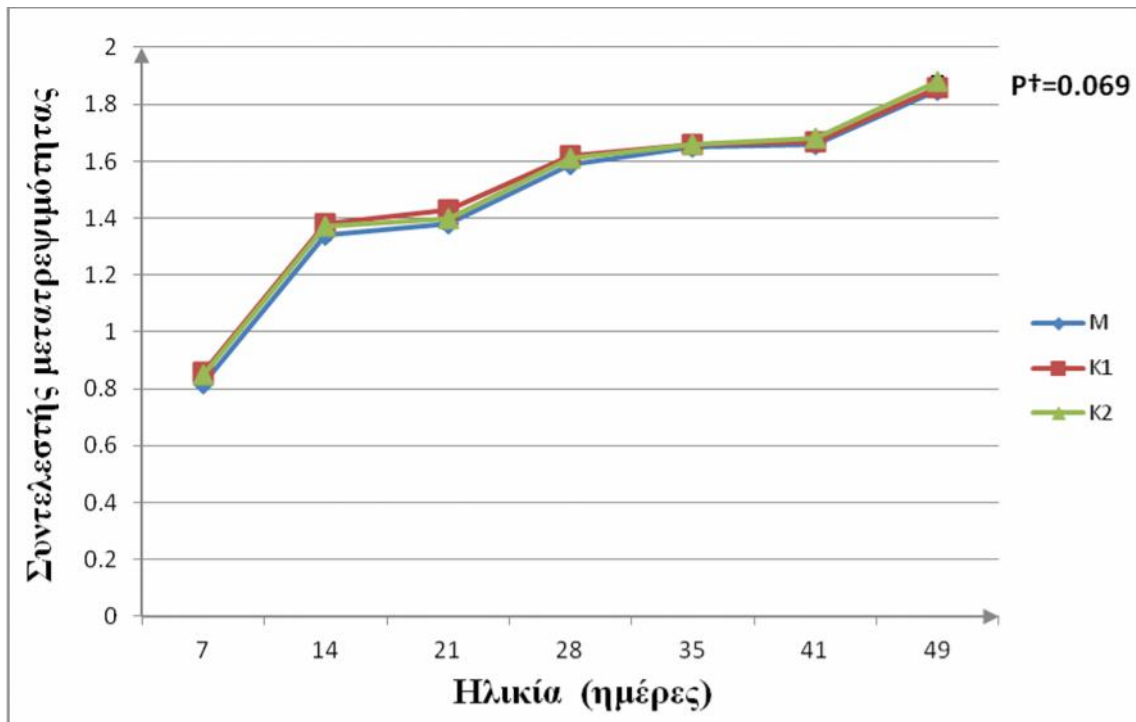


Διάγραμμα 3.2.2 Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ορνίθιο στη διάρκεια της εκτροφής στις τρεις επεμβάσεις (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων±Τυπικό Σφάλμα).

† Το επίπεδο σημαντικότητας για την επίδραση της επέμβασης με κερσετίνη στο σωματικό βάρος σε όλη τη διάρκεια του πειράματος με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ήταν $P=0.4555$.

3.3 Συντελεστής μετατρεψιμότητας

Στο **διάγραμμα 3.3.1** παρουσιάζεται ο μέσος όρος ελαχίστων τετραγώνων (Μ.Ο.Ε.Τ.) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) του αθροιστικού συντελεστή μετατρεψιμότητας (Σ.Μ.) των ορνιθίων από την 7^η μέχρι την 49^η ημέρα. Η καταγραφή του μέσου αθροιστικού συντελεστή μετατρεψιμότητας γινότανε ανά 7 ημέρες με εξαίρεση τις δύο τελευταίες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 41 και 49. Σύμφωνα με το **διάγραμμα 3.3.1** φαίνεται η σταδιακή αύξηση του μέσου αθροιστικού συντελεστή μετατρεψιμότητας από την πρώτη μέχρι την τελευταία μέτρηση και συγκεκριμένα η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε τη 14^η ημέρα. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των επεμβάσεων Μ και Κ₁ και Κ₂. Ωστόσο τα ορνίθια που λάμβαναν κερσετίνη εμφάνισαν τάση αύξησης του συντελεστή μετατρεψιμότητας σε σχέση με τα ορνίθια της επέμβασης Μ καθώς το επίπεδο σημαντικότητας ήταν $P = 0.069$ (**Πίνακας 3.3.1**).



Διάγραμμα 3.3.1 Μέσος αθροιστικός συντελεστής μετατρεψιμότητας των ορνιθίων ανά εβδομάδα στις τρεις επεμβάσεις (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων±Τυπικό Σφάλμα).

† Το επίπεδο σημαντικότητας για την επίδραση της επέμβασης με κερσετίνη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ήταν $P = 0.069$.

Πίνακας 3.3.1 Μέσος αθροιστικός συντελεστής μετατρεψιμότητας των ορνιθίων ανά εβδομάδα στις τρεις επεμβάσεις (Μέσος Όρος Ελαχίστων Τετραγώνων±Τυπικό Σφάλμα).

Ημέρες	Επέμβαση Μ	Επέμβαση Κ ₁	Επέμβαση Κ ₂	Τυπικό σφάλμα
7	0.82	0.86	0.86	0.016
14	1.34	1.39	1.37	0.016
21	1.39	1.43	1.41	0.016
28	1.59	1.62	1.62	0.016
35	1.65	1.66	1.66	0.016
41	1.67	1.68	1.69	0.016
49	1.86	1.87	1.88	0.016

3.4 Καταγραφή θνησιμότητας ορνιθίων

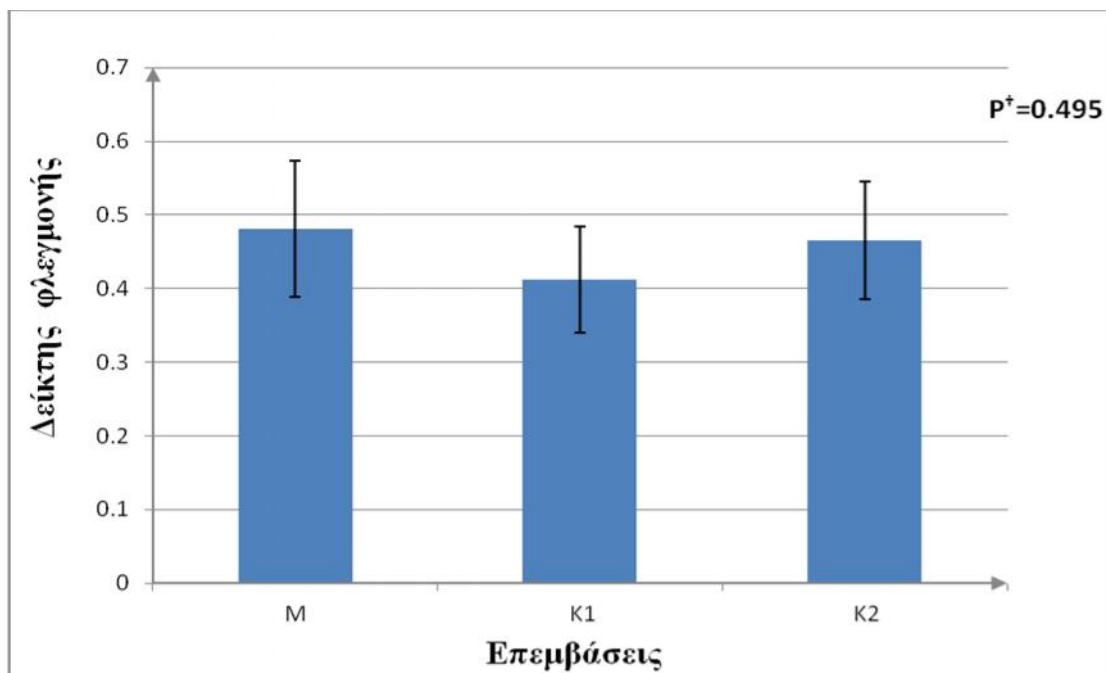
Στην επέμβαση Μ ο αριθμός των νεκρών ορνιθίων ήταν 4 (**Πίνακας 3.4**). Τα συγκεκριμένα πτηνά απεβίωσαν την 4^η, 7^η, 10^η και 21^η ημέρα. Στην επέμβαση Κ₁ ο αριθμός των νεκρών πτηνών ήταν 2. Αυτά τα πτηνά απεβίωσαν την 7^η και 9^η ημέρα. Τέλος, στην επέμβαση Κ₂ υπήρχαν επίσης 2 νεκρά πτηνά, την 7^η και 9^η ημέρα. Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανήλθε σε 5.3% (8% στην ομάδα Μ και 4% στις ομάδες Κ₁ και Κ₂).

Πίνακας 3.4 Η θνησιμότητα των ορνιθίων κατά τη διάρκεια της εκτροφής στις τρεις επεμβάσεις.

ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΗΜΕΡΕΣ	ΝΕΚΡΑ ΠΤΗΝΑ	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ(%)
Μ	4 ^η , 7 ^η , 10 ^η , 21 ^η	4	8
Κ ₁	7 ^η , 9 ^η	2	4
Κ ₂	9 ^η , 13 ^η	2	4

3.5 Δοκιμή της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA)

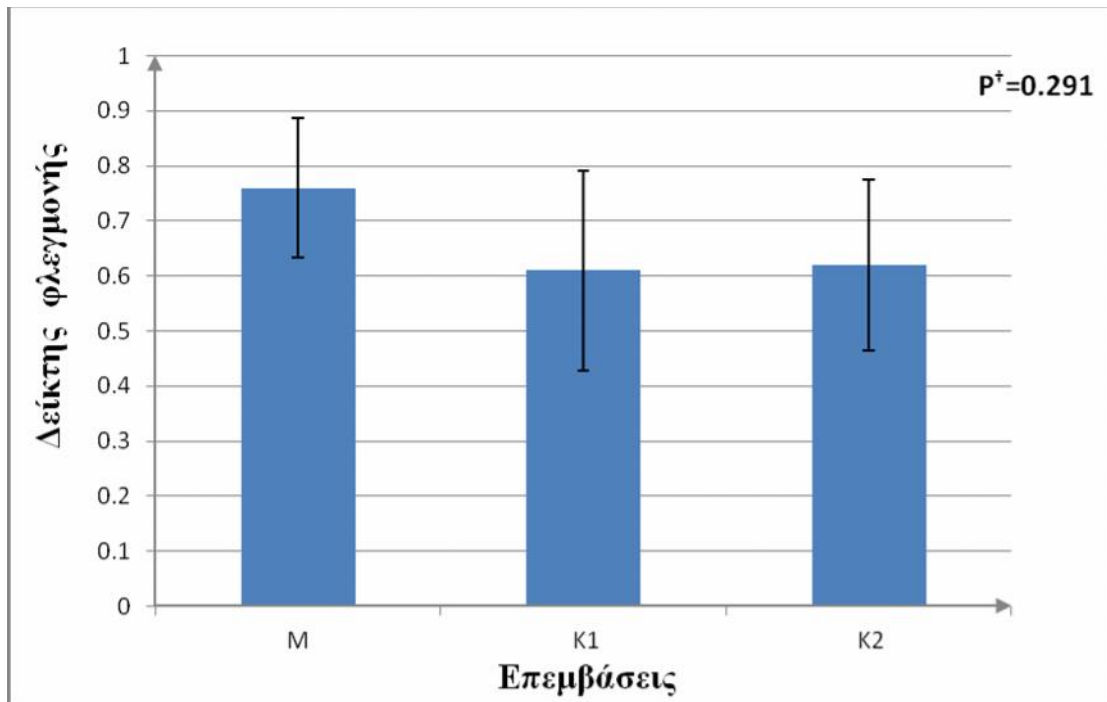
Στο **διάγραμμα 3.5.1** φαίνεται ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) του δείκτη φλεγμονής ύστερα από τη χορήγηση φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) στα ορνίθια την 15^η ημέρα. Διαπιστώνεται ότι ο δείκτης φλεγμονής ήταν υψηλότερος στην επέμβαση Μ, στη συνέχεια στην επέμβαση Κ₂ και τέλος στην επέμβαση Κ₁. Παρόλα αυτά η επέμβαση χορήγηση κερσετίνης δεν είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση στο δείκτη φλεγμονής (P=0.495).



Διάγραμμα 3.5.1 Επίδραση 1^{ης} δοκιμασίας φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) στα ορνίθια. Το διάγραμμα απεικονίζει τους Μ.Ο.±Τ.Σ. του δείκτη φλεγμονής για κάθε επέμβαση (n = 16 / επέμβαση).

†Ο δείκτης σημαντικότητας για την επίδραση κερσετίνης στο δείκτη φλεγμονής είναι P=0.495.

Η δοκιμή της φυτοαιμαγλουτινίνης επαναλήφθηκε την 48^η ημέρα με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά η συγκέντρωση του διαλύματος της PHA ήταν 5 φορές μικρότερη σε σχέση με την πρώτη. Επίσης τη δεύτερη φορά η ένεση δεν πραγματοποιήθηκε στη διαδακτύλια μεμβράνη ανάμεσα στο τρίτο και στο τέταρτο δάκτυλο των ορνίθων (όπως την πρώτη), αλλά ανάμεσα στο δεύτερο και στο τρίτο δάκτυλο της διαδακτύλιας μεμβράνης. Στο **διάγραμμα 3.5.2** παρουσιάζονται ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) του δείκτη φλεγμονής στις τρεις επεμβάσεις. Ο δείκτης φλεγμονής ήταν υψηλότερος στην επέμβαση Μ, σε σύγκριση με αυτούς στις επεμβάσεις Κ₁ και Κ₂. Όμως και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές είναι στατιστικώς μη σημαντικές μεταξύ των ομάδων.



Διάγραμμα 3.5.2 Επίδραση 2^{ης} δοκιμασίας φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) στα ορνίθια. Το διάγραμμα απεικονίζει τους Μ.Ο.±Τ.Σ. του δείκτη φλεγμονής για κάθε επέμβαση (n = 16 / επέμβαση).

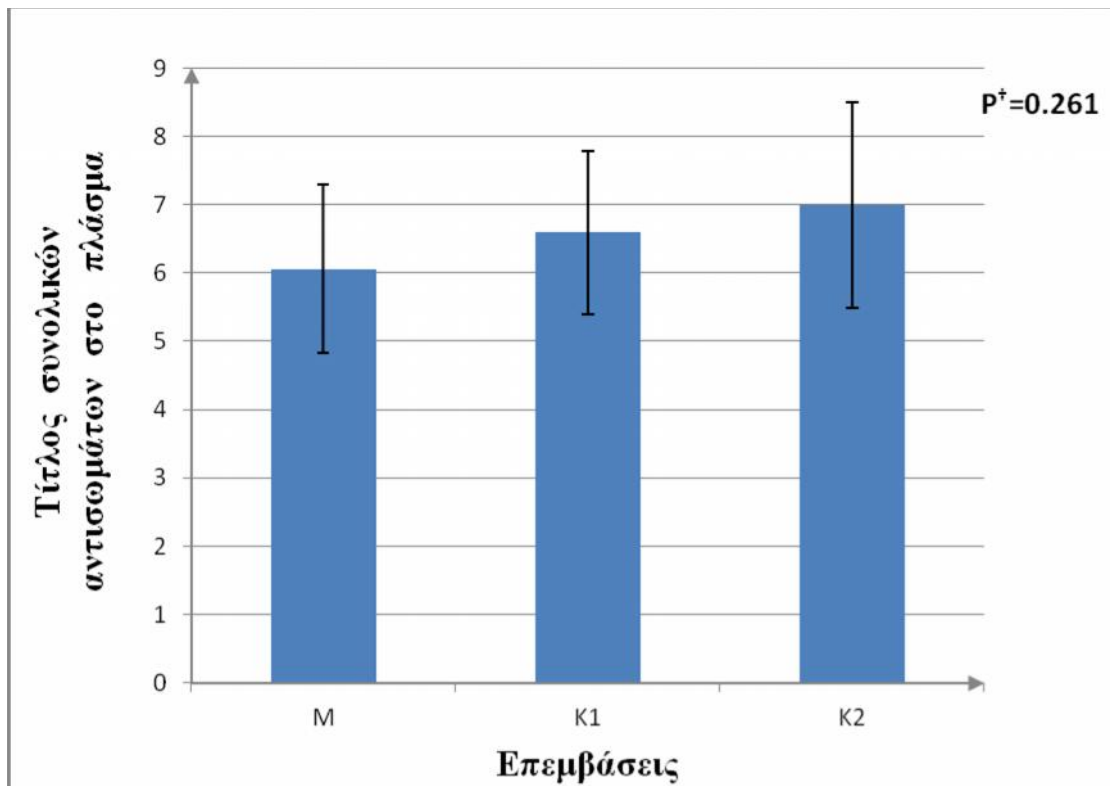
†Ο δείκτης σημαντικότητας για την επίδραση κερσετίνης στο δείκτη φλεγμονής είναι $P=0.291$.

3.6 Τιτλοδότηση των παραγόμενων ειδικών αντισωμάτων στα ορνίθια μετά από ανοσοποίηση με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (Sheep Red Blood Cell - SRBC)

Στο πείραμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) του συνολικού τίτλου των ειδικών αντισωμάτων κατά του SRBC στον ορό των ορνιθίων 6 ημέρες μετά την ανοσοποίηση. Ειδικότερα μετρήθηκε ο τίτλος των αντισωμάτων καθώς και ο τίτλος των IgG και IgM ειδικών ανοσοσφαιρινών. Η σύγκριση του τίτλου των αντισωμάτων στις επεμβάσεις Μ, Κ₁ και Κ₂ έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις, για την παραγωγή των συνολικών αντισωμάτων (**διάγραμμα 3.6.1**). Επίσης η παραγωγή των IgM αντισωμάτων δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις επεμβάσεις Μ, Κ₁ και Κ₂ (**διάγραμμα 3.6.2**).

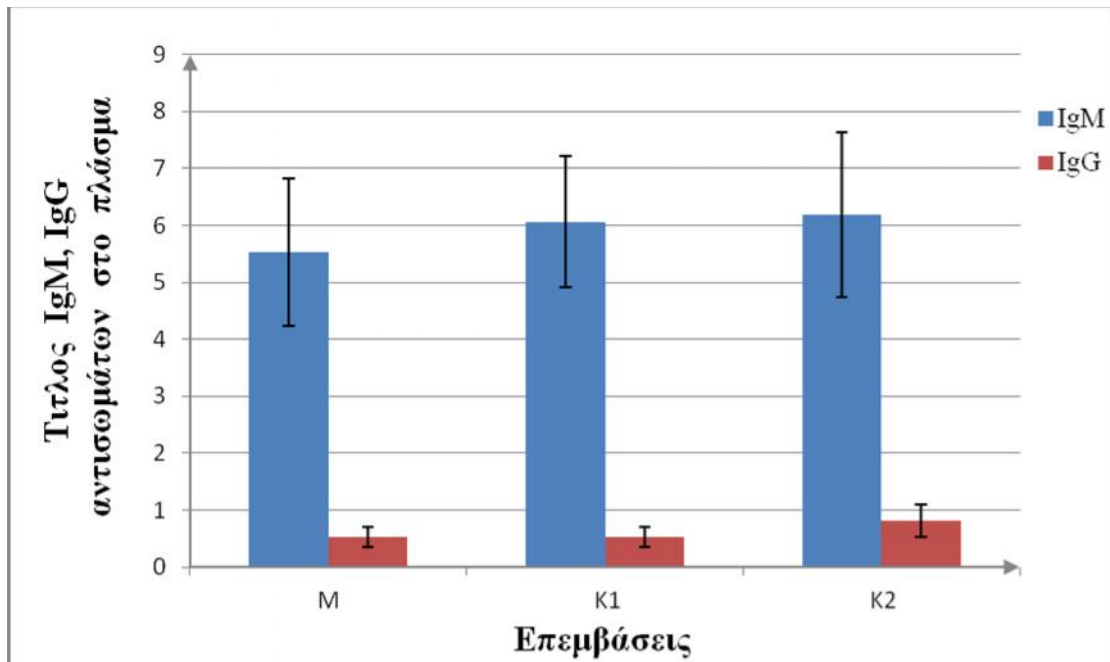
Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παραγωγή των συνολικών αντισωμάτων το φύλο φαίνεται να έχει μία τάση επίδρασης ($P=0.088$). Η παραγωγή των συνολικών αντισωμάτων είναι κατά μέσο όρο υψηλότερη στα θηλυκά ορνίθια σε σύγκριση με τα αρσενικά ορνίθια χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική ($P=0.088$). Επίσης το φύλο επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά ($P=0.036$) την παραγωγή αντισωμάτων IgG και η παραγωγή των IgG αντισωμάτων είναι υψηλότερη στα θηλυκά

ορνίθια. Τέλος το φύλο δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση στην παραγωγή των IgM αντισωμάτων ($P=0.108$) (διάγραμμα 3.6.3).

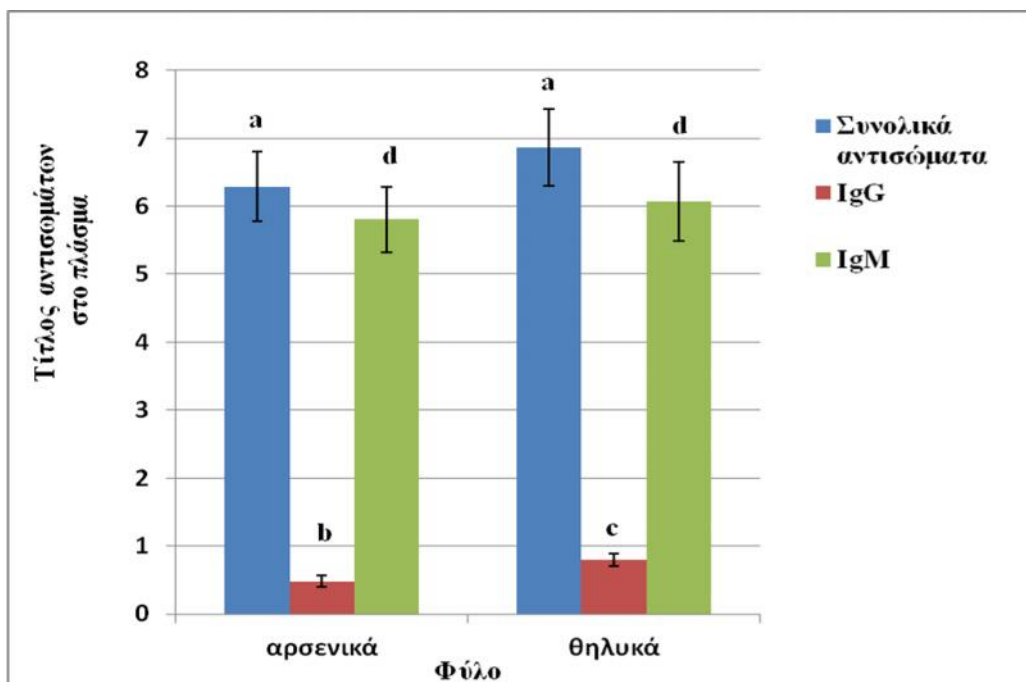


Διάγραμμα 3.6.1 Μέσος όρος τίτλου συνολικών αντισωμάτων (M.O.±T.Σ.) στο πλάσμα των ορνιθίων ($n = 16$ / επέμβαση).

†Ο δείκτης σημαντικότητας για την επίδραση κερσετίνης στον τίτλο αντισωμάτων στο πλάσμα είναι $P=0.261$.



Διάγραμμα 3.6.2 Μέσος όρος τίτλου IgM και IgG αντισωμάτων (Μ.Ο.±Τ.Σ.) στο πλάσμα των ορνιθίων (n = 16 / επέμβαση, $P^{IgM}=0.116$, $P^{IgG}=0.195$).



Διάγραμμα 3.6.3 Επίδραση του φύλου στον τίτλο αντισωμάτων (Μ.Ο.±Τ.Σ.) (αριθμός ♂ = 26, αριθμός ♀ = 22)

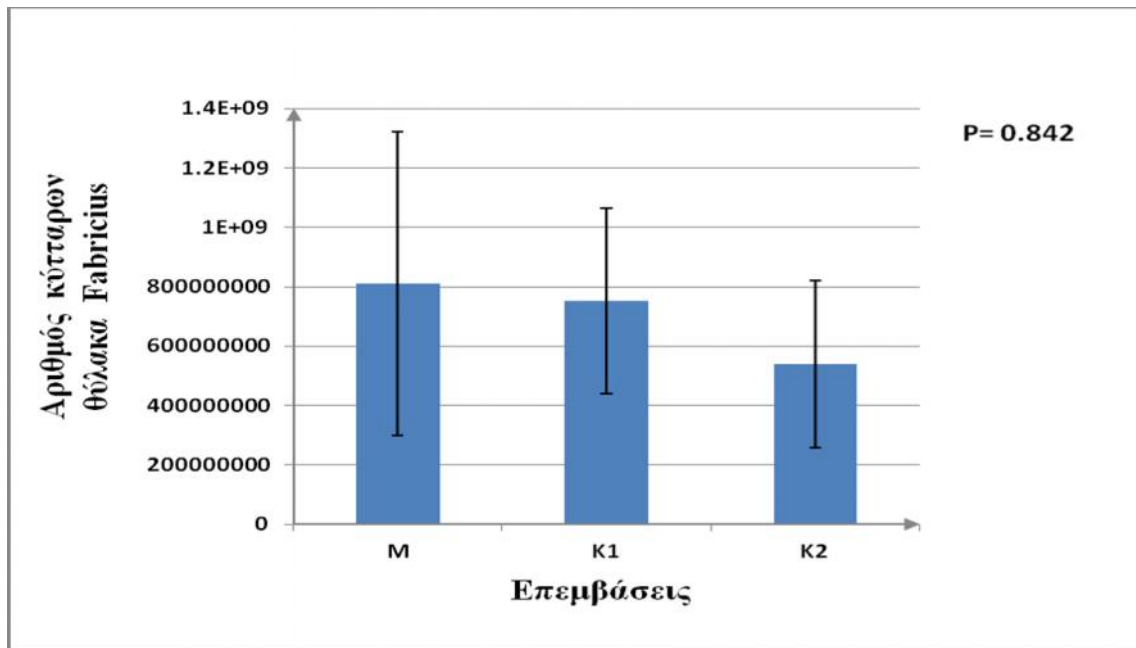
b, c: Μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα ανά είδος αντισωμάτων διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά $P=0.036$.

3.7 Αριθμός κυττάρων του θύλακα *Fabricius* και του θύμου

Η μορφολογική και η κυτταρική σύσταση των λεμφικών οργάνων και ιδιαιτέρως του θύλακα *Fabricius*, του θύμου και του σπλήνα αποτελεί δείκτη κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος των πτηνών. Ο θύλακας του *Fabricius* ανήκει στα πρωτογενή λεμφικά όργανα και λειτουργεί ως ένα κεντρικό λεμφικό όργανο, όπου πραγματοποιείται η ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων που ρυθμίζουν τη χυμική ανοσία του οργανισμού. Ο θύλακας λειτουργεί ως όργανο συνάθροισης ανώριμων κυττάρων τα οποία παράχθηκαν στο μυελό των οστών και πολλαπλασιάζονται με μεγάλη ταχύτητα, αλλά το 90-95% από αυτά πεθαίνουν με απόπτωση. Πτηνά χωρίς το θύλακα *Fabricius* παρουσιάζουν ελάχιστη μείωση του συνολικού αριθμού λεμφοκυττάρων. Όμως παρατηρείται σημαντική μείωση του αριθμού των πλασματοκυττάρων, των κυττάρων δηλαδή που παράγουν και εκκρίνουν αντισώματα. Αυτά τα πτηνά παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία σε μολύνσεις (σαλμονέλλωση) αλλά όχι όμως και σε βακτήρια τα οποία καταστρέφονται από την κυτταρική ανοσία (Tizard, 2004).

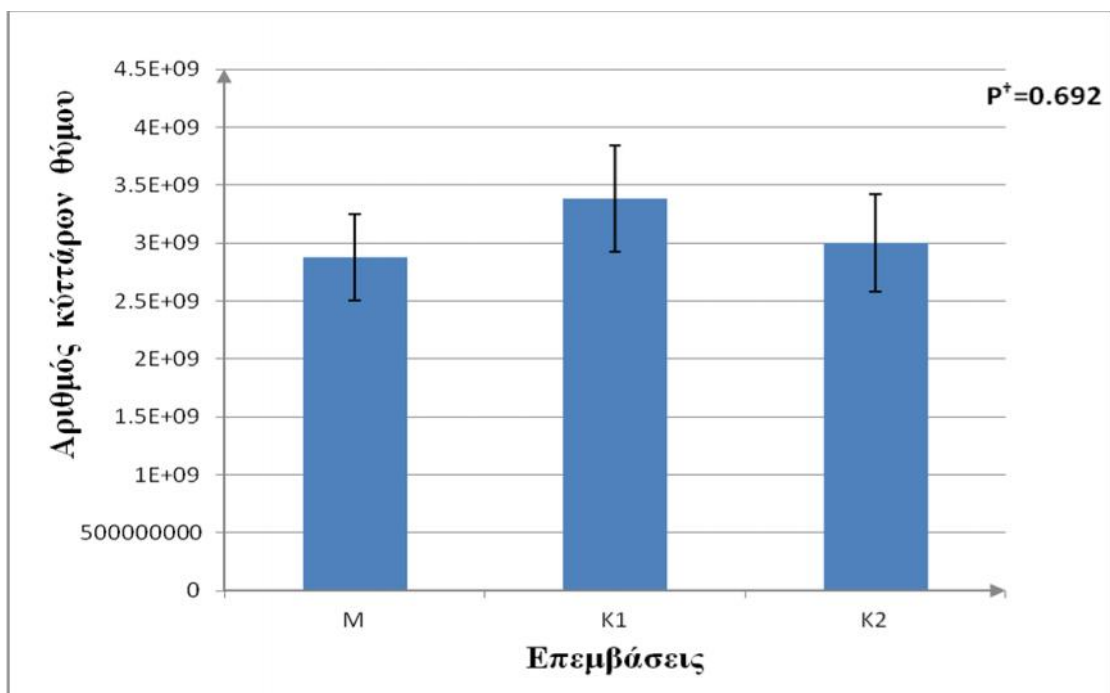
Ο θύμος αδένας ανήκει και αυτός στα πρωτογενή λεμφικά όργανα. Αποτελεί πηγή των Τ-λεμφοκυττάρων του αίματος που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυτταρικών ανοσοαντιδράσεων, καθώς με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η κυτταρική ανοσία του οργανισμού. Η απουσία του θύμου αδένος έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση του αριθμού των Τ-λεμφοκυττάρων στο αίμα και της εμφάνισης κυτταρικής ανοσοαντίδρασης. Τα αρχέγονα κύτταρα που θα εξελιχθούν σε Τ-λεμφοκύτταρα έχουν ως αρχική προέλευση το μυελό των οστών και στη συνέχεια μεταναστεύουν στο θύμο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Από τη στιγμή που εισέρχονται στο θύμο πραγματοποιείται η ωρίμανσή τους. Τα περισσότερα από τα παραγόμενα νέα κύτταρα πεθαίνουν γρήγορα, ενώ από τα επιζώντα μόνο ένα μικρό ποσοστό (5%) παραμένουν στο θύμο, για 4-5 ημέρες, πριν μεταναστεύσουν σε δευτερογενή λεμφικά όργανα (Tizard, 2004).

Στο πείραμα υπολογίστηκαν ο κυτταρικός αριθμός του θύλακα και του θύμου στα ορνίθια των τριών επεμβάσεων (M, K₁ και K₂). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές (P>0.05) μεταξύ των επεμβάσεων M, K₁ και K₂ όσον αφορά τόσο τον αριθμό των κυττάρων του θύλακα (**διάγραμμα 3.7.1**), όσο και τον αριθμό κυττάρων θύμου (**διάγραμμα 3.7.2**).



Διάγραμμα 3.7.1 Αριθμός κυττάρων θύλακα *Fabriciella* των ορνιθίων στις τρεις επεμβάσεις (ΜΟ±ΤΣ) (n = 6 / επέμβαση).

†P: δείκτης σημαντικότητας της επίδρασης της κερσετίνης στο αριθμό κυττάρων του θύλακα *Fabriciella*

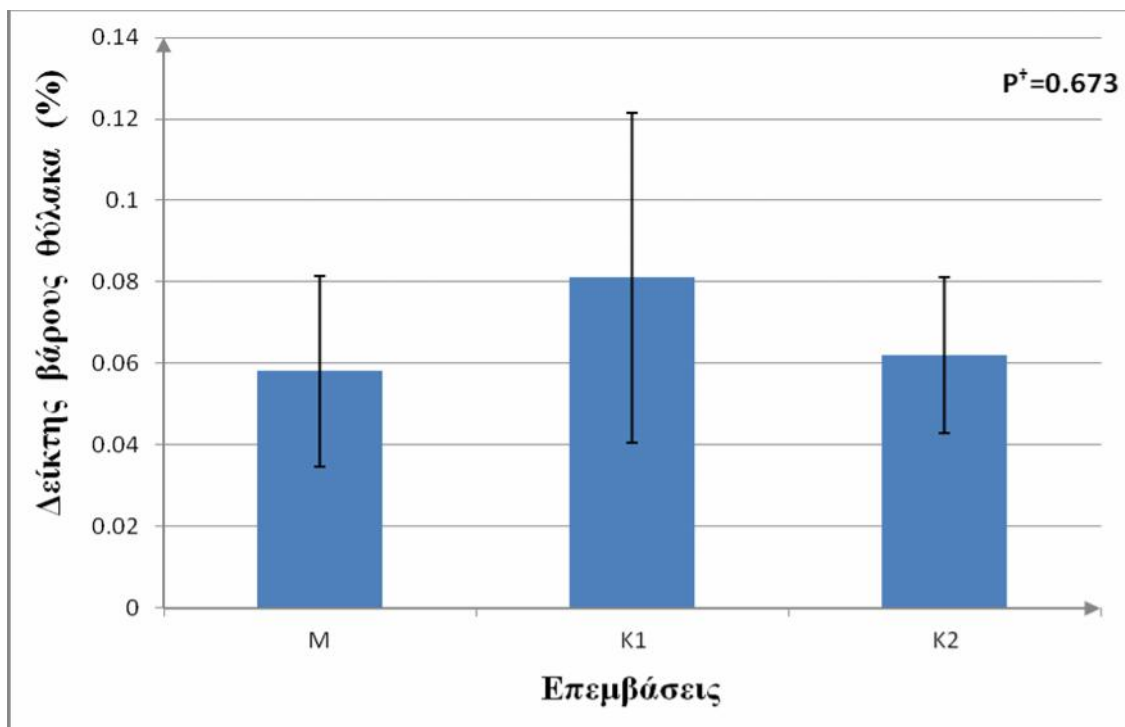


Διάγραμμα 3.7.2 Αριθμός κυττάρων θύμου στις τρεις επεμβάσεις (ΜΟ±ΤΣ) (n =16 / επέμβαση).

†P: δείκτης σημαντικότητας της επίδρασης της κερσετίνης στο αριθμό κυττάρων θύμου

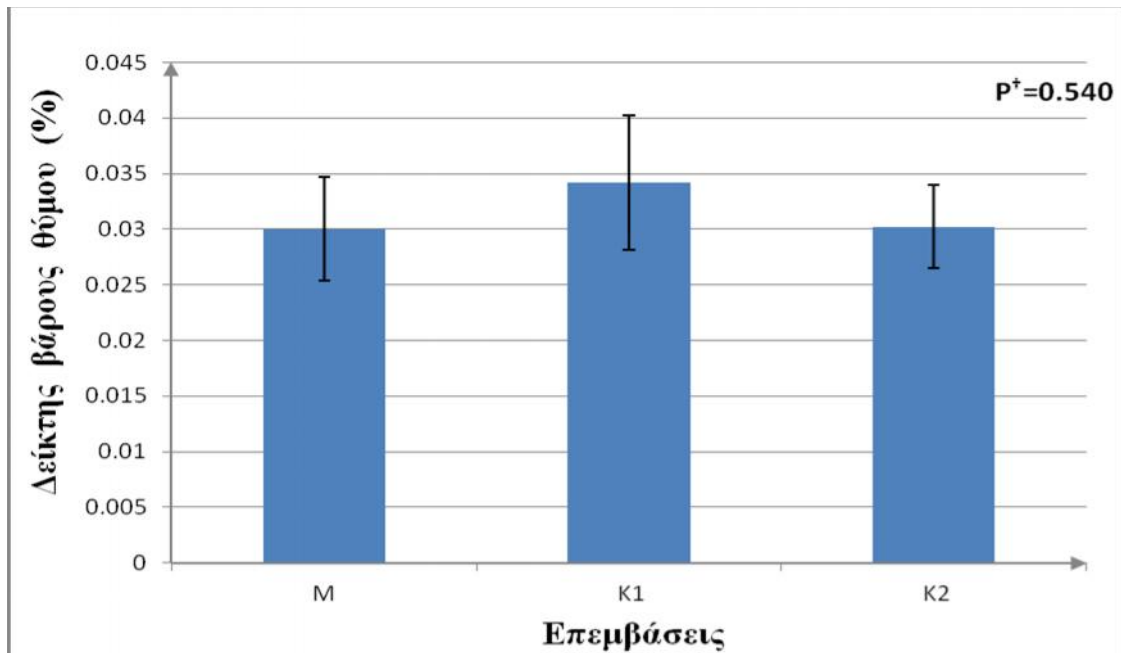
3.8 Δείκτης βάρους θύλακα *Fabricius*, θύμου και σπλήνα

Στο πείραμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) για τους δείκτες του βάρους του θύλακα, του θύμου και του σπλήνα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο δείκτη βάρους του θύλακα μεταξύ των επεμβάσεων (διάγραμμα 3.8.1). Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα για το δείκτη βάρους του θύμου (διάγραμμα 3.8.2) καθώς δεν παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) ανάμεσα στις επεμβάσεις Μ, Κ₁ και Κ₂. Τέλος, ούτε στο δείκτη του σπλήνα παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων, (διάγραμμα 3.8.3).



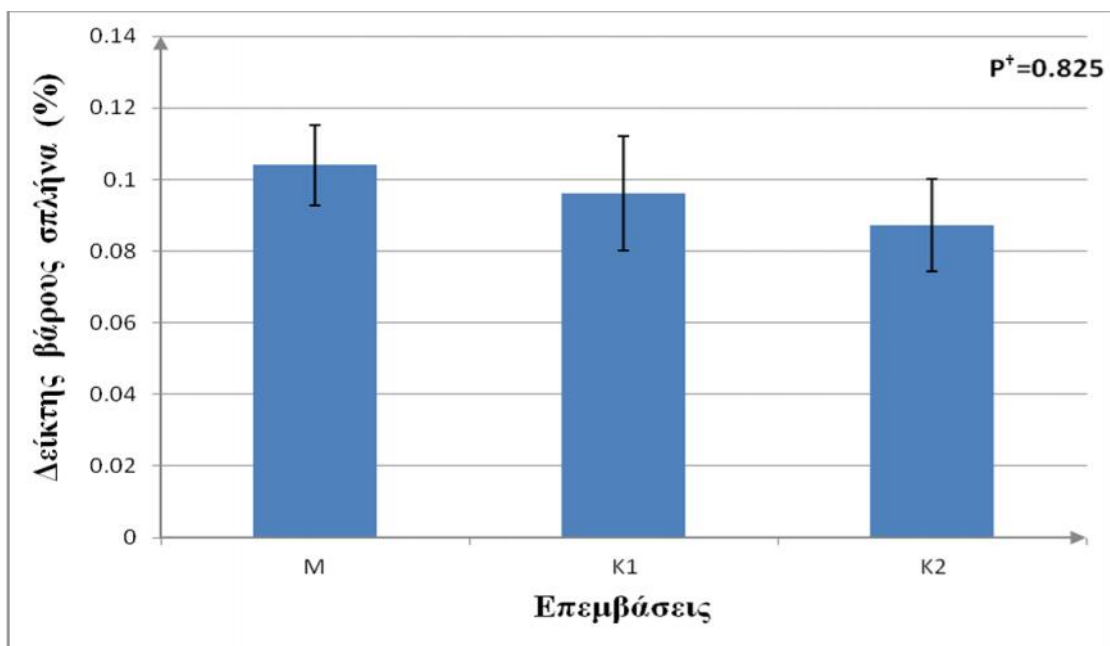
Διάγραμμα 3.8.1 Μέσος όρος δείκτης βάρους του θύλακα *Fabricius* των ορνιθίων και τυπικό σφάλμα ανά επέμβαση ($n = 6$ / επέμβαση).

†P: δείκτης σημαντικότητας της επίδρασης της κερσετίνης στο δείκτη βάρους του θύλακα *Fabricius*.



Διάγραμμα 3.8.2 Μέσος όρος δείκτη βάρους του θύμου των ορνιθίων και τυπικό σφάλμα ανά επέμβαση (n = 16 / επέμβαση).

†P: δείκτης σημαντικότητας της επίδρασης της κερσετίνης στο δείκτη βάρους του θύμου.



Διάγραμμα 3.8.3 Μέσος όρος δείκτη βάρους του σπλήνα των ορνιθίων και τυπικό σφάλμα ανά επέμβαση (n = 16 / επέμβαση).

†P: δείκτης σημαντικότητας της επίδρασης της κερσετίνης στο δείκτη βάρους του σπλήνα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κερσετίνη, ένα φυσικό αντιοξειδωτικό, έχει αποδειχθεί ότι έχει ανοσοτροποποιητική δράση τόσο στον άνθρωπο όσο και σε τρωκτικά. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες σε ορνίθια. Για το λόγο, αυτό μελετήθηκε η επίδραση της κερσετίνης στο ανοσοποιητικό σύστημα και σε ορισμένες ζωοτεχνικές παραμέτρους ορνιθίων κρεοπαραγωγικού τύπου. Συγκεκριμένα, στο σωματικό βάρος, στη μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής και στο συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής των ορνιθίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, δε βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο μέσο όρο του σωματικού βάρους των πτηνών των τριών επεμβάσεων από την ημέρα 0-51, ωστόσο από ζωοτεχνικής απόψεως τα ορνίθια που έλαβαν κερσετίνη ήταν κατά μέσο όρο βαρύτερα από τα ορνίθια που δεν έλαβαν. Όσον αφορά τη μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής, είναι μεγαλύτερη στα πτηνά της επέμβασης K₂, στη συνέχεια στα ορνίθια της επέμβασης K₁ και τέλος στα ορνίθια της επέμβασης M. Όμως και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές είναι στατιστικώς μη σημαντικές (P>0.05). Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα και για το μέσο αθροιστικό συντελεστή μετατρεψιμότητας (49^η ημέρα) της τροφής, καθώς και εδώ οι διαφορές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (P>0.05). Επομένως συμπεραίνουμε ότι η χορήγηση κερσετίνης δεν είχε επίδραση στο σωματικό βάρος, στη μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής και στο μέσο αθροιστικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής των ορνιθίων.

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αντίστοιχα πειράματα χορήγησης κερσετίνης σε ορνίθια, για αυτό και η σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με πειράματα χορήγησης άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών. Πείραμα σε όρνιθες κρεοπαραγωγικού τύπου (Simitzis *et al.*, 2011) έδειξε ότι μετά από χορήγηση εσπεριδίνης ή Βιταμίνης E στα πτηνά δε διαπιστώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά (P>0.05) στο τελικό βάρος και στη μετατρεψιμότητα της τροφής των πτηνών. Η εκτροφή είχε διάρκεια 40 ημέρες. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στη μελέτη των Pena *et al.*, (2008) όταν χορηγήθηκε ασκορβικό οξύ σε συνδυασμό με κερσετίνη και ρουτίνη σε 400 όρνιθες κρεοπαραγωγικού τύπου. Το πείραμα είχε διάρκεια 32 ημέρες. Η ηλικία των πτηνών ήταν μίας ημέρας και στο πείραμα οι όρνιθες είχαν χωριστεί σε 4 επεμβάσεις ανάλογα με τη χορήγηση ασκορβικού οξέος και φλαβονοειδών (0, 250, 500, 1000 g/ton). Ωστόσο η χορήγηση κερσετίνης ήταν σε πολύ μικρό ποσοστό (0, 0.30, 0.61 και 1.22 g/ton). Από την επεξεργασία των δεδομένων προέκυψε ότι το σωματικό βάρος και η κατανάλωση τροφής των ορνιθίων δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (P>0.05) μεταξύ των επεμβάσεων. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα στη δική μας μελέτη καθώς τόσο το σωματικό βάρος όσο και η κατανάλωση τροφής των ορνιθίων δεν είχαν διαφορές (P>0.05). Σε πείραμα των Niu *et al.*, (2009) χορηγήθηκε βιταμίνη E σε αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου ηλικίας μίας ημέρας. Το πείραμα είχε διάρκεια 42 ημέρες και τα πτηνά είχαν χωριστεί σε 3 επεμβάσεις ανάλογα με τη χορήγηση βιταμίνης E (0, 100, 200 mg/kg). Παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές (P>0.05) μεταξύ των

τριών επεμβάσεων, τόσο για το σωματικό βάρος όσο και για την κατανάλωση τροφής. Βρέθηκαν όμως στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) στο συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής ανάμεσα στις επεμβάσεις. Συγκεκριμένα η επέμβαση με τη χορήγηση 100 mg/kg βιταμίνης E είχε καλύτερο συντελεστή μετατρεψιμότητας τροφής σε σχέση με τις άλλες δύο επεμβάσεις. Σε άλλο πείραμα (Jiang *et al.*, 2007) που πραγματοποιήθηκε, 1500 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου κατανάλωσαν ισοφλαβόνες σόγιας. Τα ορνίθια ήταν χωρισμένα σε 5 επεμβάσεις ανάλογα με την ποσότητα ισοφλαβόνης σόγιας που τους είχε χορηγηθεί στο σιτηρέσιο (0, 10, 20, 40, 80 mg/kg). Διαπιστώθηκαν διαφορές (στατιστικώς σημαντικά βελτιωμένη, $P < 0.05$) τόσο στο βάρος των πτηνών (χορήγηση 20mg/kg), όσο στην κατανάλωση της τροφής (χορήγηση 20mg/kg) και το συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (χορήγηση 10mg/kg).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η χορήγηση κερσετίνης σε ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου δεν επιδρά στο σωματικό τους βάρος. Αντίστοιχα είναι και τα πειραματικά δεδομένα για την επίδραση της χορήγησης άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών (εσπεριδίνη, βιταμίνη E, ασκορβικό οξύ σε συνδυασμό με κερσετίνη και ρουτίνη) όπως περιγράφεται παραπάνω. Αντίθετα η χορήγηση ισοφλαβόνης σόγιας είχε θετική επίδραση στο σωματικό βάρος των ορνιθίων. Όσον αφορά τη μετατρεψιμότητα της τροφής τα αποτελέσματά μας δε δείχνουν επίδραση της χορήγησης κερσετίνης και είναι αντίστοιχα με πειραματικά δεδομένα για τη χορήγηση εσπεριδίνης, ασκορβικού οξέος (σε συνδυασμό με κερσετίνη και ρουτίνη) και βιταμίνης E (200mg/kg τροφής). Αντίθετα η βιταμίνη E σε συγκέντρωση 100 mg/kg και οι ισοφλαβόνες σόγιας βελτιώνουν το συντελεστή μετατρεψιμότητας.

Εκτός από τη μελέτη των ζωοτεχνικών παραμέτρων, στο πείραμα εξετάστηκε και η ανοσοτροποποιητική δράση της κερσετίνης για τη μελέτη της ομοιόστασης των οργάνων του ανοσοποιητικού συστήματος. Με βάση τα αποτελέσματά μας η χορήγηση κερσετίνης δεν επιδρά στο δείκτη βάρους του θύλακα *Fabricious*, του θύμου και του σπλήνα. Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα των των Niu *et al.*, (2009) που έδειξαν ότι μετά από χορήγηση βιταμίνης E σε αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξομειώσεις στο βάρος του θύλακα *Fabricious*, του θύμου και του σπλήνα. Αντιθέτως οι Singh *et al.*, (2006) βρήκαν ότι με τη χορήγηση βιταμίνης E (200 mg/kg) και σεληνίου (0.2 mg/kg) σε ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) το βάρος του σπλήνα και του θύλακα *Fabricious*.

Επιπρόσθετα μελετήθηκε και ο αριθμός κυττάρων του θύλακα *Fabricious* και του θύμου. Διαπιστώθηκε ότι τα ορνίθια που έλαβαν σιτηρέσιο με τη υψηλότερη ποσότητα κερσετίνης είχαν το μικρότερο αριθμό κυττάρων του θύλακα. Όμως οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές ($P > 0.05$). Όσον αφορά τον αριθμό κυττάρων θύμου, είναι μεγαλύτερος στα πτηνά της επέμβασης K_1 και στη συνέχεια στα πτηνά των επεμβάσεων K_2 και M , αλλά και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές είναι μη σημαντικές ($P > 0.05$).

Στο παρόν πείραμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος του συνολικού τίτλου των ειδικών αντισωμάτων κατά ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου και ο τίτλος των IgG και IgM ειδικών ανοσοσφαιρινών. Η σύγκριση του μέσου όρου του τίτλου των αντισωμάτων στις επεμβάσεις M, K₁ και K₂ έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (P>0.05) ανάμεσα στις επεμβάσεις, για την παραγωγή των συνολικών αντισωμάτων. Τα ορνίθια που έλαβαν σιτηρέσιο με την υψηλότερη ποσότητα κερσετίνης (επέμβαση K₂) είχαν τη μεγαλύτερη παραγωγή IgG αντισωμάτων και τα πτηνά των επεμβάσεων K₁ και M είχαν τον ίδιο τίτλο αντισωμάτων. Επίσης η παραγωγή των IgM αντισωμάτων δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά (P>0.05) ανάμεσα στις επεμβάσεις M, K₁ και K₂. Σε πείραμα των Niu *et al.*, (2009) αρσενικά ορνίθια ανοσοποιήθηκαν με SRBC 7% και μελετήθηκε η χυμική ανοσολογική απάντηση ύστερα από τη χορήγηση βιταμίνης E. Στην πρωτογενή ανοσολογική απάντηση υπήρχαν διαφορές μεταξύ και των τριών επεμβάσεων και όσο υψηλότερη ήταν η χορήγηση βιταμίνης E τόσο μεγαλύτερη ήταν η χυμική ανοσολογική απάντηση. Στη δευτερογενή χυμική ανοσολογική απάντηση υπήρχαν επίσης διαφορές (P<0.05) μεταξύ των επεμβάσεων. Συμπερασματικά, η χορήγηση βιταμίνης E επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την παραγωγή συνολικών αντισωμάτων. Ανάλογα είναι και τα συμπεράσματα των Singh *et al.*, (2006) καθώς μετά από χορήγηση εμβολίου (*Newcastle*) σε ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου βρέθηκε ότι η χορήγηση βιταμίνης E επηρέασε θετικά (P<0.05) την παραγωγή αντισωμάτων. Στο πείραμα αυτό τα ορνίθια ήταν χωρισμένα σε 3 επεμβάσεις ανάλογα με τη χορήγηση βιταμίνης E (0, 100, 200 mg/kg). Οι διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην επέμβαση με τη μεγαλύτερη χορήγηση βιταμίνης E (200 mg/kg) και στις υπόλοιπες (0, 100 mg/kg). Στη δική μας μελέτη δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων στην παραγωγή αντισωμάτων. Ωστόσο αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούν να συγκριθούν απολύτως με τα αντίστοιχα των Niu *et al.*, (2009) διότι στα πτηνά των δύο πειραμάτων δόθηκαν διαφορετικές αντιοξειδωτικές ουσίες και η συγκέντρωση SRBC ήταν διαφορετική. Όμως φαίνεται να υπάρχει μία αυξητική τάση παραγωγής αντισωμάτων (συνολικών, IgM, IgG) καθώς αυξάνεται η χορήγηση κερσετίνης (**διαγράμματα 3.6.1 και 3.6.2**). Αξίζει να σημειωθεί ότι το φύλο φαίνεται να έχει μία τάση επίδρασης (P=0.088) στην παραγωγή συνολικών αντισωμάτων, καθώς είναι υψηλότερη στα θηλυκά ορνίθια. Επίσης το φύλο επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά (P=0.036) την παραγωγή IgG αντισωμάτων, καθώς τα αντισώματα είναι υψηλότερα στα θηλυκά ορνίθια. Σε άλλα πειράματα (Khatibjoo *et al.*, 2011) παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων στα αρσενικά σε σύγκριση με τα θηλυκά ορνίθια και μειωμένη ανθεκτικότητα σε λοιμώξεις. Ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα αρσενικά ορνίθια έχουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα θηλυκά και υπάρχει αρνητική συσχέτιση του ρυθμού ανάπτυξης και της ανθεκτικότητας σε ασθένειες.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε και η ικανότητα αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος των ορνιθίων στη δοκιμή της φυτοαιμαγλουτινίνης (*in vivo*) που διεγείρει την κυτταρική ανοσία. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε δύο φορές και στη δεύτερη μέτρηση η συγκέντρωση του διαλύματος της PHA ήταν πέντε φορές μικρότερη σε σχέση με την πρώτη. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκε η δεύτερη

μέτρηση είναι διότι θα μπορούσε να παρατηρηθεί διαφορά στη φλεγμονώδη αντίδραση ανάμεσα στις επεμβάσεις. Ενδεχομένως, μικρότερο ερέθισμα να αποκάλυπτε διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων που δεν ήταν ανιχνεύσιμες με ισχυρότερο ερέθισμα ύστερα από το οποίο είναι πιθανόν να έχει κορεστεί η δυνατότητα αντίδρασης των πτηνών. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τόσο στην πρώτη όσο και στη δεύτερη μέτρηση δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις των ορνιθίων (M, K₁, K₂). Με βάση τη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν αντίστοιχα *in vivo* πειράματα κερσετίνης σε ορνίθια που να υπολογίζεται ο δείκτης φλεγμονής ύστερα από ανοσοποίηση με φυτοαιμαγλουτινίνη. Υπάρχουν όμως *in vitro* και *in vivo* πειράματα κερσετίνης σε τρωκτικά και *in vitro* πειράματα στον άνθρωπο. Σε έρευνα των Comalada *et al.*, (2006) σε αρουραίους διαπιστώθηκε αντιφλεγμονώδης δράση της κερσετίνης καθώς προκλήθηκε διέγερση της κυτοκίνης IL-10, μειώθηκε η ενεργοποίηση των μακροφάγων κυττάρων και εμποδίστηκε η παραγωγή ογκονεκρωτικών παραγόντων (TNFα) ύστερα από ενεργοποίηση με λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Σε άλλο πείραμα (Huang *et al.*, 2010) με αρουραίους, αποδείχτηκε ότι η κερσετίνη μειώνει τη δράση των δένδριτικών κυττάρων με αναστολή της λειτουργίας των λιποπολυσακχαριτών. Επίσης με τη δράση της κερσετίνης μειώνεται η παραγωγή κυτοκινών που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση καθώς επίσης και η δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων. Συνοψίζοντας, η κερσετίνη είναι ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας που μελετάται για τη συμβολή της στην πρόληψη και τη θεραπεία της χρόνιας φλεγμονής. Στις συνθήκες του δικού μας πειράματος και με τη συγκεκριμένη δοκιμή που χρησιμοποιήθηκε (PHA) δεν παρατηρήθηκε επίδραση της κερσετίνης στη φλεγμονώδη αντίδραση των ορνιθίων.

Συμπερασματικά η χορήγηση κερσετίνης σε ορνίθια κρεοπαραγωγικού τύπου δεν επηρέασε θετικά - αρνητικά την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος των ορνιθίων στις δοκιμασίες της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) και της ανοσοποίησης με ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (SRBC). Επίσης δεν επηρέασε την ομοιόσταση του θύμου, του θύλακα *Fabricius* και του σπλήνα, όσον αφορά το βάρος και τον αριθμό των κυττάρων τους. Επιπρόσθετα μετά από τη χορήγηση κερσετίνης δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε ζωοτεχνικές παραμέτρους, δηλαδή στο σωματικό βάρος των ορνιθίων, στη μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής και στο μέσο αθροιστικό συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής. Θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον μελλοντικά να εξεταστούν η βιοδιαθεσιμότητα της κερσετίνης σε ορνίθια και να μελετηθούν και άλλες παράμετροι της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας για να επιβεβαιωθεί εάν χορήγηση κερσετίνης σε ορνίθια προκαλεί ή όχι ανοσοτροποποιητική δράση αντίστοιχη με αυτή σε άλλους οργανισμούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Atkinson C., Berman S., Humbert O., Lampe J.W., 2004. In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *Journal of Nutrition.*, 134: 596–599.
- Balazs L. and Leon M.,1994. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochemical Research*, 19: 1131-1137.
- Boots A.W., Haenen G.R.M.M., Bast A.,2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585, 325-337.
- Bureau G., Longpré F., Martinoli M.G., 2008. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *Journal Neuroscience, Res.* 86, 403–410 (Electronic publication ahead of print).
- Chen C.H., Pearson A.M. and Gray J.I., 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry* 45, 177-183.
- Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina FS, Zarzuelo A., 2006. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, 72:1010-21.
- Διαμαντίδης Γ., 1994. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. 2^η Έκδοση. *Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών*. Θεσσαλονίκη.
- Fairbrother A., Smits J., Grasman K. A., 2004. Avian immunotoxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.*, 7:105–137.
- Fairweather – Tait J.S.,1999. The Importance of Trace Element Speciation in Nutritional Sciences. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 363, pp. 536-540.
- Friedman M., 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition Food Research*, 51: 116–134.
- Gordon M., 2001. Antioxidants in food. *Woodhead publishing limited*. Cambridge England.

- Harborne J.B., Williams C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481–504.
- Huang R.Y., Yu Y.L., Cheng W. C., OuYang C. N., Fu E., Chu C. L., 2010. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *Journal of Immunology*, 184:6815-6821.
- Hollman P.C.H. and Katan M.B., 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. & Pharmacother*, 51: 305-310.
- Hollman P. C. H., van Trijp J. M. P., Buysman M. N. C. P., Gaag M. S. v. d., Mengelers M. J. B., de Vries J. H. M., Katan M.B., 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418, 152–156.
- Jiang Z.Y., Jiang S.C., Lin Y.C., Xi P.B., Yu D.Q., Wu T.X., 2007. Effects of Soybean Isoflavone on Growth Performance, Meat Quality, and Antioxidant in Male Broilers. *Poultry Science*, 86:1356-1362.
- Kahl. R and Hildebrandt A.G., 1986. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 24: 1007-1014.
- Kandaswami C.and Middleton E., 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plantflavonoids. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 366, pp. 351–376.
- Kanner J., 1994. Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, 36, 169-189.
- Khatibjoo A., Kermanshahi H., Golian A., Zaghari M., 2011. The effect of dietary n-6:n-3ratio and sex on broiler breeder immunity. *Poultry Science*, 10:2209-16.
- Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620–650.
- Lochmiller R. L., Vestey M. R., and Boren J. C., 1993. Relationship between protein nutritional status and immunocompetence in northern bobwhite chicks. *American Ornithologists Union*, 110:503–510.
- Lavoie E. T., Grasman K. A., 2007. Effects of In Ovo Exposure to PCB_s 126 and 77 on Mortality, Deformities and Post-hatch Immune Function in Chickens. *Journal of Toxicology and Enviromental Health*, 70: 547-558.
- MacNee W., 2001. Oxidative stress and lung inflammation in airway diseases. *European Journal of Pharmacology*., 429, 195–207.

- Magder S., 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life. *Critical Care* 10, 208.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C. and Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Manjeet K.R., Ghosh B., 1999. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. *International Journal Immunopharmacology*, 21, 435–443.
- Middleton E., 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 439, pp. 175–182.
- Middleton E. and Kandaswami C., 1986. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, J.B. Harborne, Editor, *The Flavonoids: Advances in Research Since (1986)*, Chapman & Hall, London (1993), pp. 619–645.
- Murota K. and Terao J., 2003. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417, 12–17.
- Nagendran B., Kalyana S., Samir S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Niu Z. Y., Liu F. Z., Yan Q. L. and Li W. C., 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science*, 88 :2101–2107.
- Orsolic N., Knezevic A.H., Sver L., Terzic S., Basic I., 2004. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal Ethnopharmacology*, 94, 307–315.
- Parr A. J. and Bolwell, G. P., 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 985–1012.
- Pena J.E.M, Vieira S.L., Lopez J., Reis R.N., Barros R., Furtado F.V.F., Silva P.X., 2008. Absorbic Acid and Citric Flavonoids for Broilers Under Heat Stress: Effects on Performance and Meat Quality. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 10, 125-130.
- Pokorny J., 2001. Preparation of natural antioxidants. In: Antioxidants in food. J. Pokorny, Yanishlieva N. and Gordon M. (eds). CRC Press. Woodhead Publishing Limited.

- Rafii F., Davis C., Park M., Heinze T.M. & Beger R.D., 2003. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch Microbiology*, 180: 11–16.
- Rafii F., Hotchkiss C., Heinze T.M. & Park M., 2004. Metabolism of daidzein by intestinal bacteria from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Comprehensive Medical*, 54: 165–169.
- Rahman I., 2002. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochemical. Pharmacology*, 64, 935–942.
- Ratledge C., Wynn J.P. 2006. Microbial production of oils and fats. In: *Food Biotechnology*, Second Edition. Taylor and Fancis, p. 460-481.
- Read M.A., 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *American. Journal of Pathology*, 147, 235–237.
- Sakanashi Y., Oyama K., Matsui H., Oyama T.B., Oyama T.M., Nishimura Y., Sakai H., Oyama Y., 2008. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca^{2+} : a model experiment. *Life Sciences*, 83: 164-169.
- Sarraga C. and Rigueiro J.A., 1999. Membrane lipid oxidation and proteolytic activity in thigh muscles from broilers fed different diets. *Meat Science*, 52, 213-219.
- Serafini M., Peluso I. and Raguzzini A., 2009. Antioxidants and the immune system. *Nutricion society*, 69, 273-278.
- Simitzis P. E., Symeon G. K., Charismiadou M. A., Ayoutanti A. G., Deligeorgis S. G., 2011. The effects of dietary hesperidin supplementation on broiler performance and chicken meat characteristics. *Canadian. Journal of Animal Science*, 91: 275-282.
- Singh H., Sodhi S, and Kaur. R., 2006. Effects of dietary supplements of selenium, vitamin E or combinations of the two on antibody response of broilers. *Poultry Science*, 47:714–719.
- Stadecker M. J., Lukic M., Dvorak A., and Leskowitz S., 1977. The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. *Journal of Immunology*, 118:1564–1568.
- Stewart L. K., Soileau J. L., Ribnicky D., Wang Z Q., Raskin I., Poulev A., Majewski M., Cefalu W. T. and Gettys T.W., 2008. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, 57 , S39-S46.
- Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D., Buckley D.J., Morrissey P.A., 2001. Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long – term frozen stored chicken meat. *Meat science.*, 57, 331-336.

- Timberlake CF, Henry BS, 1986. Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*, 10:31–36.
- Tizard I. R., 2004. *Veterinary Immunology – Introduction*. Seventh edition. Elsevier, USA, Μετάφραση – Επιμέλεια Κοπτόπουλος Γ. Σ.(2007). Κτηνιατρική Ανοσολογία Εισαγωγή *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου*. Αθήνα.
- SAS, 2002. SAS Systems for Windows 9.0. SAS Institute Inc., Cary NC, USA.
- USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods,
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/Flav02-1.pdf>
- Vasanth R., Clinton M.R., Bruce R., Robin A. B., 2010. Absorption and tissue distribution of dietary quercetin and quercetin glycosides of apple skin in broiler chickens. *Journal Science of Agricultural*, 90:1172-1178.
- Walle T., Otake Y., Walle U.K. and Wilson[†] F.A.,2000. Quercetin Glucosides Are Completely Hydrolyzed in Ileostomy Patients before Absorption. *Journal of Nutrition*,130:2658-2661.
- Walle T., 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology Medicine*, 36: 829–837.
- Wenk C., 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 282-289.
- Wilson B.R., Pearson A.M. and Shorland F.B., 1976. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavour in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 24, 7-11.
- Yang CS, Sang S, Lambert JD & Lee MJ, 2008. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular Nutrition of Food Research*, 52: S139–S151.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V., 2001. Inhibiting oxidation. In: *Antioxidants in food. Practical applications*. Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (eds). Woodhead Publishing Limited, CRC Press, pp. 22-70.
- Young IS., and McEneny J., 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29: 358-362.