

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ  
ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ Η ΟΞΙΝΙΣΤΩΝ ΕΠΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ  
ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ  
ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ**

ΙΡΙΔΑ Ν. ΠΑΛΑΜΙΔΗ

Επιβλέπων: Μουντζούρης Κωνσταντίνος, Αν. Καθηγητής

**ΑΘΗΝΑ 2019**

# ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

## ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ Η ΟΞΙΝΙΣΤΩΝ ΕΠΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ

ΙΡΙΔΑ Ν. ΠΑΛΑΜΙΔΗ

### **Εξεταστική επιτροπή:**

Μουντζούρης Κωνσταντίνος, Αν. Καθηγητής (Επιβλέπων)

Οικονομόπουλος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Συμβουλευτική επιτροπή)

Χάγερ Αριάνδη Λουκία, Επίκουρος Καθηγήτρια (Συμβουλευτική επιτροπή)

Φεγγερός Κωνσταντίνος, Καθηγητής (Εξεταστική επιτροπή)

Χαδιώ-Μάντζαρη Στέλλα, Καθηγήτρια (Εξεταστική επιτροπή)

Φλώρου-Πανέρη Παναγιώτα, Καθηγήτρια (Εξεταστική επιτροπή)

Χρηστάκη-Σαδικάκη Ευτέρπη, Καθηγήτρια (Εξεταστική επιτροπή)

**ΑΘΗΝΑ 2019**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ Η ΟΞΙΝΙΣΤΩΝ  
ΕΠΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ  
ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ**

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιέργειών,  
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 118 55*

## **A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης ενός οξιμιστή και δύο τύπων προβιοτικού (ενεργού ή θερμικά αδρανοποιημένου) επί κρίσιμων βιοδεικτών του εντερικού οικοσυστήματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν: η αύξηση ζώντος βάρους (AZB), η κατανάλωση τροφής, ο συντελεστής εκμετάλλευσης (ΣΕ), ο δείκτης παραγωγικής αποδοτικότητας, η πεπτικότητα της ξηράς ουσίας (ΞΟ), της οργανικής ουσίας (ΟΟ), των λιπαρών ουσιών (ΛΟ), και των ελεύθερων αζώτου εκχυλισματικών ουσιών και η κατακρατηθείσα ενέργεια. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν η γονιδιακή έκφραση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα (*TGF-β4*), της ιντερφερόνης-γ (*IFN-γ*), της ιντερλευκίνης (*IL*) -12p40, της *IL2*, της *IL18*, της *IL10*, της *IL22* και της επαγωγίσιμης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (*iNOS*). Τέλος, προσδιορίστηκε η γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών *ZO1* και *ZO2* (*ZO1*, *ZO2*) της κλαουδίνης 1 και 5 (*CLDN1*, *CLDN5*), της οκλουδίνης (*OCLN*), της υπομονάδας 1 του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β (*NFKB1*) και των toll – like υποδοχέων 2 και 4 (*TLR2B* και *TLR4*).

Δύο πολυπαραγοντικά πειράματα σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν, τα οποία περιελάμβαναν διατροφικό πρόγραμμα τριών φάσεων, συνολικής διάρκειας 42 ημερών. Για κάθε φάση καταρτίστηκε βασικό ισόρροπο σιτηρέσιο (ΒΣ). Για τη μελέτη της επίδρασης του οξιμιστή σχεδιάστηκε ένα 2×2 παραγοντικό πείραμα με κύριους παράγοντες την προσθήκη του οξιμιστή (0 και 1g οξιμιστή/kg τροφής) και της αβιλαμκίνης (0 και 2,5 mg αβιλαμκίνης/kg τροφής). Ακολούθως, 544 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες επεμβάσεις, C: ΒΣ, AV: ΒΣ + 2,5 mg αβιλαμκίνης/kg τροφής, AC: ΒΣ + 1g οξιμιστή/kg τροφής, ACAV: AC+AV. Για τη μελέτη της προσθήκης των δύο τύπων προβιοτικού σχεδιάστηκε ένα 3×2 παραγοντικό πείραμα με κύριους παράγοντες την προσθήκη του τύπου του προβιοτικού (Χωρίς, ενεργό και αδρανοποιημένο) και της αβιλαμκίνης (0 και 2,5 mg αβιλαμκίνης/kg τροφής). Ακολούθως, 450 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες επεμβάσεις, CoN: ΒΣ, CoN+A: ΒΣ + 2,5 mg αβιλαμκίνης/kg τροφής, VIP: ΒΣ + 1g προβιοτικού/kg τροφής, VIP+A: VIP + 2,5 mg αβιλαμκίνης/kg τροφής,

INP: προσθήκη 1g αδρανοποιημένου προβιοτικού/kg τροφής, INP+A: INP+2,5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

Τα συνολικά παραγωγικά χαρακτηριστικά (AZB και ΣΕ), η πεπτικότητα της ΞΟ, της ΟΟ και η κατακρατηθείσα ενέργεια βελτιώθηκαν με την προσθήκη οξινιστή ή αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο. Στον σπλήνα, η αβιλαμυκίνη είχε αντιφλεγμονώδη επίδραση μειώνοντας την έκφραση της *IFN-γ*, της *IL18* και της *iNOS*. Η ταυτόχρονη προσθήκη οξινιστή και αβιλαμυκίνης ενίσχυσε την φυσική ανοσιακή απόκριση στα τυφλά έντερα, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης των *IL10*, *IL18* και *IL22*. Η αβιλαμυκίνη έδρασε αντιμικροβιακά στο περιεχόμενο του ειλεού μειώνοντας τη συγκέντρωση του πληθυσμού *Clostridium perfringens* subgroup. Η προσθήκη οξινιστή ή αβιλαμυκίνης ρύθμιζε αρνητικά την έκφραση των *ZO1*, *OCLN* και *CLDN5*. Η χορήγηση αβιλαμυκίνης ρύθμιζε αρνητικά την έκφραση υποδοχέων της φυσικής ανοσίας (*TLR2* και *TLR4*) και την έκφραση του *NFKB1*. Η χορήγηση οξινιστή επηρέασε θετικά τη σύσταση της μικροχλωρίδα στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων, αυξάνοντας τους πληθυσμούς *Clostridium coccoides* subgroup και *Clostridium leptum* subgroup.

Ο τύπος προσθήκης του προβιοτικού και η αβιλαμυκίνη επέδρασαν θετικά στα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Σημαντικές αλληλεπιδράσεις παρουσιάστηκαν στην ειλεακή πεπτικότητα της ΞΟ και στην ολική πεπτικότητα της ΞΟ και των ΛΟ. Η προσθήκη ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού ή / και αβιλαμυκίνης είχε αντιφλεγμονώδη δράση μειώνοντας την έκφραση της *iNOS* στα τυφλά έντερα. Επίσης η προσθήκη αβιλαμυκίνης μείωσε την έκφραση της *IFN-γ* στα τυφλά έντερα. Η αβιλαμυκίνη έδρασε αντιμικροβιακά στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων μειώνοντας τη συγκέντρωση των *Lactobacillus spp.* και του πληθυσμού *Clostridium perfringens* subgroup αντίστοιχα. Ο ζωντανός τύπος προβιοτικού μείωσε στον ειλέο και στα τυφλά έντερα την έκφραση του *NFKB1* ενός από τους κεντρικούς μεσολαβητές της φλεγμονής. Η προσθήκη ζωντανού προβιοτικού τροποποίησε την έκφραση υποδοχέων της φυσικής ανοσίας (*TLR2B* και *TLR4*) στα τυφλά έντερα. Η χορήγηση ζωντανού προβιοτικού ή αβιλαμυκίνης τροποποίησε τη ρύθμιση της μεταγραφής συστατικών του εντερικού φραγμού στα τυφλά έντερα, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης των *OCLN* και *CLDN5*.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ευεργετική επίδραση των βιοενεργών υλών που χρησιμοποιήθηκαν (οξινιστής, ζωντανός και αδρανοποιημένος προβιοτικός τύπος) επί της ανάπτυξης των ορنيθίων

κρεοπαραγωγής καθώς και επί επιλεγμένων πεπτικών, ανοσιακών και μικροβιολογικών δεικτών του εντερικού οικοσυστήματος.

**Λέξεις κλειδιά:** ορνίθια κρεοπαραγωγής, παραγωγικά χαρακτηριστικά, πεπτικότητα, κυτταροκίνες, μικροχλωρίδα, εντερικός φραγμός, στενή σύνδεση, ειλεός, τυφλά έντερα.

# INVESTIGATION OF DIETARY SUPPLEMENTATION EFFECTS OF PROBIOTICS OR ACIDIFIER ON CRITICAL BIOMARKERS OF THE INTESTINAL ECOSYSTEM OF BROILER CHICKENS

*Department of Animal Science & Aquaculture,*

*Laboratory of Nutritional Physiology and Feeding, Iera Odos 75, Athens 118 55*

## **B. ABSTRACT**

The aim of this PhD thesis was to investigate the effect of an acidifier and the probiotic type (viable or thermally inactivated) on critical biomarkers of the intestinal ecosystem of broilers. In particular, within the context of this thesis the following have been studied: body weight gain (BWG), feed intake, feed conversion ratio (FCR), production efficiency index, the digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), ether extracts (EE), ash and nitrogen-free extracts and retained energy. In addition, gene expression of transforming growth factor b4 (TGF- $\beta$ 4), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL) -12p40, IL2, IL18, IL10, IL22 and inducible nitric oxide synthase 2 (iNOS) was determined. Lastly, gene expression of zonula occludens 1 and 2 (ZO1 and ZO2), claudin 1 and 5 (CLDN1 and CLDN5), occludin (OCLN), nuclear factor kappa B subunit 1 (NFKB1) and toll-like receptors 2 and 4 (TLR2B and TLR4) was determined.

Two multi-factorial experiments were designed and performed, in which a 3-phase feeding schedule was implemented. The total duration of both experiments was 42 days (Starter 1-14 days, grower, 15-28 days, finisher 29-42 days). For each phase, a balanced diet based on maize and soybean meal (BD) was formulated. To study the effect of the acidifier a 2 $\times$ 2 factorial experimental was designed with main factors, the inclusion of the acidifier (0 and 1 g/kg of diet) and avilamycin (0 and 2.5 mg/kg of diet). Subsequently, 544-day-old male Cobb 500 broilers were allocated to four treatments, C: BD with no other addition, AV: BD + 2.5 mg avilamycin/kg feed, AC: BD + 1 g acidifier/kg diet, ACAV: AC+AV. To study the effect of the probiotic form a 3 $\times$ 2 factorial experimental was designed with main factors the inclusion of probiotic type (NoP, viable and inactive) and avilamycin (0 and 2.5 mg/kg of diet). Subsequently, 450-day-old male Cobb 500 broilers were allocated six treatments, CoN: BD with no other addition, CoN+A: BD + 2.5 mg avilamycin/kg feed), ViP: 1 g viable probiotic/kg of feed, ViP+A: ViP + 2.5 mg avilamycin/kg feed, InP: 1g inactivated probiotic/kg of feed, InP+A: InP + 2.5 mg avilamycin/kg feed.

Overall performance (BWG and FCR), digestibility of DM and OM and retained energy was improved by acidifier or avilamycin addition. In the spleen, avilamycin had an anti-inflammatory effect by reducing the expression of *IFN- $\gamma$* , *IL18* and *iNOS*. The combination of acidifier with avilamycin (ACAV) enhanced natural immunity response at cecal tonsils by elevating expression of *IL10*, *IL18* and *IL22*. Avilamycin incorporation had an antimicrobial effect at ileal digesta by reducing the concentration of *Clostridium perfringens* subgroup. The incorporation of acidifier or avilamycin negatively regulated the expression of *ZO1*, *OCN* and *CLDN5* at ceca. The addition of avilamycin resulted in *TLR2B*, *TLR4* and *NFKB1* reduced expression. Acidifier addition positively affected cecal digesta, by increasing the levels of *Clostridium coccooides* subgroup and *Clostridium leptum* subgroup.

Probiotic form and avilamycin had a positive effect on performance. Significant interaction effects were detected on ileal digestibility of DM of and total digestibility of DM and EE. Addition of viable or inactive probiotic and/or avilamycin had an anti-inflammatory effect at the ceca, by reducing the expression of *iNOS*. Moreover, the addition of avilamycin reduced the expression of *IFN- $\gamma$* . Avilamycin had an antimicrobial effect at the ileal digesta and cecal digesta, by reducing the concentration of *Lactobacillus spp.* and *C. perfringens* subgroup respectively. At ileum the inclusion of viable probiotic reduced the expression of *NFKB1*, a pivotal mediator of inflammatory responses. Viable probiotic addition modulated negatively gene expression of natural immune receptors (*TLR2B* and *TLR4*) and *NFKB1* at ceca. The administration of viable probiotic or avilamycin negatively regulated the expression of *OCN* and *CLDN5* at ceca.

In conclusion, the results of this study provide important information on the beneficial effect of the bioactive ingredients used (acidifier, viable probiotic, and inactive probiotic) on broiler performance and a selection of digestive, immunological and microbiological biomarkers of the intestinal ecosystem.

**Key words:** broiler, performance, digestibility, cytokines, microflora, gut barrier, tight junction, ileum, cecum

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτό το δύσκολο, απαιτητικό και εποικοδομητικό ταξίδι, μου δίνεται η ιδιαίτερη χαρά να ευχαριστήσω τους δασκάλους, συναδέλφους, φίλους και συγγενείς για τις συμβουλές τους, την υπομονή τους και την ηθική υποστήριξη. Θα ήθελα λοιπόν να καταθέσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή κ. Ζέρβα Γ. για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Οικονομόπουλο Ι. και την Επίκουρο Καθηγήτρια Χάγερ-Θεοδωρίδου Α. για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή και τις πολύτιμες υποδείξεις τους, τον Καθηγητή κ. Φεγγερό Κ. για τη συμμετοχή του στην εξεταστική μου επιτροπή αλλά και για τη βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, τις Καθηγήτριες κ.κ. Χαδιώ-Μάντζαρη Σ., Χρηστάκη-Σαδικάκη Ε. και Φλώρου-Πανέρη Π., για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, τον κ. Παπαδομιχελάκη, Γ. Επίκουρο Καθηγητή, και την κ. Καρακατσούλη Ν. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια για τις συμβουλές τους, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής για την υποστήριξή τους, την κ. Γεωργιάδου Μ. ΕΤΕΠ για τη βοήθεια της, την Ιωάννα και τον Μανώλη για τη βοήθεια τους στις πειραματικές εκτροφές, τη Φαίη, τη Σταυρούλα, την Ελένη, τον Χρήστο, την Ειρήνη, τη Νιόβη, την Τατιανή, την Άνδρα και τη Λίλη για τη βοήθεια τους, τον Παρασκευά Β. συνυποψήφιο διδάκτορα για τη βοήθεια του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής μου και για την ευχάριστη παρέα του, τις φίλες μου, Αλκηστη, Λένα, Βιολέττα, και Νατάσα και για την ηθική υποστήριξη, την μητέρα μου Ελευθερία, την αδερφή μου Κορίνα και τον Κωστή που μου έδωσαν τις βάσεις για να φτάσω μέχρι εδώ, με υποστήριξαν και μου έδιναν πάντα κουράγιο να συνεχίζω, τον άντρα μου Γιώργο που συμμεριζόταν όλες μου τις ανησυχίες και προσπαθούσε να μου βρει λύση στα προβλήματά μου και τον μικρό μου Ορφέα που μου έκανε την πιο καλή παρέα κατά τη διάρκεια της συγγραφής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή μου Μουντζούρη Κων/νο (Αναπληρωτή Καθηγητή) ο οποίος ήταν συνοδοιπόρος μου καθόλη τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού. Από την αρχή της πτυχιακής μου εργασίας μέχρι και το τέλος της συγγραφής του διδακτορικού μου με ενθάρρυνε, με παρακινούσε να γίνω μία άρτια ερευνήτρια, μη συμβιβασόμενη με ημίμετρα, δημιουργώντας τα δικά μου μονοπάτια, και κατανοώντας εις βάθος όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Τον ευχαριστώ και πάλι θερμά που αποτέλεσε τη κινητήρια δύναμη μου, και που με έκανε να αγαπήσω την μικροβιολογία και το εντερικό οικοσύστημα.



<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>Σελίδα</b>
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	III
B. ABSTRACT	VI
Γ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Δ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	3
1. ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ	3
1.1 Εντερικός φραγμός	3
1.1.1 Βλέννη	4
1.1.2 Στενή σύνδεση	4
1.1.3 Οκλουδίνη	4
1.1.4 Κλαουδίνες	5
1.1.5 Zonula occludens πρωτεΐνες	6
1.2 Ανοσιακό σύστημα του εντερικού βλεννογόνου	7
1.2.1 Αναγνώριση μικροβίων εντός του εντερικού σωλήνα - υποδοχείς Toll-like	9
1.2.2 Κυτταροκίνες	11
1.2.2.1 Λειτουργία κυτταροκινών και iNOS	13
1.3 Εντερική μικροχλωρίδα	15
1.3.1 Απόικηση και κατανομή της μικροχλωρίδας στον εντερικό σωλήνα	16
1.3.2 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα	17
1.3.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας	17
1.3.2.2 Διαφοροποίηση της σύστασης κατά μήκος του εντερικού σωλήνα	17
1.3.3 Ρόλος της μικροχλωρίδας	22
1.3.4 Συσχετισμός φυσιολογικής μικροχλωρίδας με παραγωγικά χαρακτηριστικά	22
1.3.5 Μεταβολική δραστηριότητα	23
2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ	25
2.1 Αντιμικροβιακοί αυξητικοί παράγοντες	25
2.1.1 Μηχανισμός δράσεις των ΑΑΠ	26
2.2 Οξινιστές / Οργανικά οξέα	27

2.2.1 Ορισμός, είδη και αντιβακτηριακή δράση οργανικών οξέων	28
2.2.2 Μηχανισμός δράσης / Επιδράσεις των οξινιστών σε ορνίθια κρεοπαραγωγής	29
2.3 Προβιοτικά	32
2.3.1 Ορισμός και κριτήρια επιλογής	32
2.3.2 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών	33
2.3.2.1 Αντιμικροβιακή δράση	33
2.3.2.2 Ενίσχυση της εντερικής ακεραιότητας	35
2.3.2.3 Ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης	36
3. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	37
Ε. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	38
4. ΣΚΟΠΟΣ	38
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΖΩΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	39
5.1 Χώρος διεξαγωγής των πειραμάτων	39
5.2 1 <sup>η</sup> πειραματική μελέτη	39
5.3 2 <sup>η</sup> πειραματική μελέτη	42
5.4 Παράμετροι που προσδιορίστηκαν	46
5.4.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά	46
5.4.2 Ολική και ειλεακή πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας	47
5.4.3 Δειγματοληψία ιστών	48
5.4.4 Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα των ορνιθίων	48
5.4.4.1 Απομόνωση RNA από τον σπλήνα και τους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου	48
5.4.4.2 Ακεραιότητα του ολικού RNA	48
5.4.4.3 Αντίστροφη μεταγραφή (cDNA)	49
5.4.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)	49
5.4.5 Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού	53
5.4.5.1 Επεξεργασία δειγμάτων	54

5.4.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)	54
5.4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο και στο τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών	58
5.4.6.1 Επεξεργασία δειγμάτων	58
5.4.6.2 Απομόνωση βακτηριακού DNA από δείγματα ειλεού και τυφλού εντέρου	58
5.4.6.3 Ποσοτικοποίηση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο και στο τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου	59
5.4.6.4 Πρότυπες καμπύλες αναφοράς	60
5.4.6.5 Ανασύσταση και ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών	63
5.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	64
ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - 1 <sup>η</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	65
6.1 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμκίνης επί των παραγωγικών αποδόσεων	65
6.2. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμκίνης στην ολική φαινομένη πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας	67
6.3 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα σε δευτερογενείς λεμφαδένες ορνιθίων 42 ημερών	69
6.4 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο και στα τυφλά έντερα	73
6.5 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού	78
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - 2 <sup>η</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	81
7.1 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμκίνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	81
7.2 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμκίνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων στην ειλεακή και ολική πεπτικότητα ορνιθίων 42 ημερών	84

7.3 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα σε δευτερογενείς λεμφαδένες ορνιθίων 42 ημερών	86
7.4 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο και στα τυφλά έντερα	91
7.5 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού	97
Z. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	100
8. Σχολιασμός της 1 <sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης – Οξιμιστής	100
9. Σχολιασμός 2 <sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης - Τύπος προσθήκης προβιοτικού	106
10. Γενικός σχολιασμός	114
H. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	120
Θ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	122

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	Σελίδα
Πίνακας 1.1. Επίδραση πρόσθετων υλών ή / και παθογόνων στην έκφραση γονιδίων που κωδικεύουν πρωτεΐνες του εντερικού φραγμού σε ορνίθια κρεοπαραγωγής	7
Πίνακας 1.2. Υποδοχείς Toll-like (TLRs) που απαντώνται στα ορνίθια (St. Paul <i>et al.</i> 2013)	11
Πίνακας 1.3. Κατηγοριοποίηση κυτταροκινών (Rahman and Eo 2012)	12
Πίνακας 1.4. Ποσοστιαία αναλογία των κυριότερων βακτηριακών πληθυσμών στο τυφλό έντερο ορνιθίων	21
Πίνακας 2.5. Χημικός τύπος και τιμές pKa των οργανικών οξέων που έχουν από 1-7 C	27
Πίνακας 5.6. Συστατικά (g / kg), εκτιμηθείσα χημική σύσταση (g / kg) και ενέργεια (Mj/kg τροφής) των σιτηρεσίων της 1ης πειραματικής μελέτης	41
Πίνακας 5.7. Κατανομή επεμβάσεων με βάση την τελική σύνθεση του σιτηρεσίου της 1 <sup>η</sup> πειραματικής μελέτης	42
Πίνακας 5.8. Συστατικά (g / kg), εκτιμηθείσα χημική σύσταση (g / kg) και ενέργεια (Mj/kg τροφής) των σιτηρεσίων της 2 <sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης	44
Πίνακας 5.9. Κατανομή επεμβάσεων με βάση τη τελική σύνθεση του σιτηρεσίου της 2 <sup>η</sup> πειραματικής μελέτης	45
Πίνακας 5.10. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα των ορνιθίων	51
Πίνακας 5.11. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού	57
Πίνακας 5.12. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό βακτηριακών πληθυσμών με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου	60
Πίνακας 5.13 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών αναφοράς για την ανάλυση της PCR πραγματικού χρόνου	62
Πίνακας 6.14. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης επί των παραγωγικών αποδόσεων ανά φάση ανάπτυξης και συνολικά για όλο το πείραμα	66

Πίνακας 6.15. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην ολική πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και στο ποσοστό της κατακρατηθείσας ενέργειας	68
Πίνακας 6.16. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στο ειλεακό περιεχόμενο (log βακτηριακών κυττάρων / g υγρού περιεχομένου)	74
Πίνακας 6.17. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του ειλεακού βλεννογόνου (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)	75
Πίνακας 6.18. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών του περιεχομένου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων / g υγρού περιεχομένου)	76
Πίνακας 6.19. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)	77
Πίνακας 6.20. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ1 και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού του ειλεού	79
Πίνακας 6.21. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ1 και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού των τυφλών εντέρων	80
Πίνακας 7.22. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της χορήγησης αβιλαμυκίνης επί των παραγωγικών αποδόσεων ανά φάση ανάπτυξης και συνολικά για όλο το πείραμα	83
Πίνακας 7.23. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της χορήγησης αβιλαμυκίνης στην ειλεακή και ολική πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και στο ποσοστό της κατακρατηθείσας ενέργειας	85

Πίνακας 7.24. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στο ειλεακό περιεχόμενο (log βακτηριακών κυττάρων / g υγρού περιεχομένου)	93
Πίνακας 7.25. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του ειλεακού βλεννογόνου (log κυττάρων / g κυτταρικού συσσωματώματος)	94
Πίνακας 7.26. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών του περιεχομένου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων / g περιεχομένου)	95
Πίνακας 7.27. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)	96
Πίνακας 7.28. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ1 και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού του ειλεού	98
Πίνακας 7.29. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ1 και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού των τυφλών εντέρων	99

<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ</b>	<b>Σελίδα</b>
Διάγραμμα 6.1. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή στην γονιδιακή έκφραση στην γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL12p40</i> , της <i>IL2</i> , της <i>IL18</i> , της <i>IL10</i> και της <i>iNOS</i> στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών	69
Διάγραμμα 6.2. Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση στην γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL12p40</i> , της <i>IL2</i> , της <i>IL18</i> , της <i>IL10</i> και της <i>iNOS</i> στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	70

Διάγραμμα 6.3. Αλληλεπίδραση της προσθήκης οξινιστή και αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση της <i>IL10</i> , της <i>IL18</i> και της <i>IL22</i> . Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	71
Διάγραμμα 6.4. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή στη γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IL10</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL18</i> , της <i>IL22</i> και της <i>iNOS</i> στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	71
Διάγραμμα 6.5. Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση του του <i>TGF-β4</i> , της <i>IL10</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL18</i> , της <i>IL22</i> και της <i>iNOS</i> στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	72
Διάγραμμα 7.6. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού στην γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL12p40</i> , της <i>IL2</i> , της <i>IL18</i> και της <i>iNOS</i> στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών	86
Διάγραμμα 7.7. Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στη γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL12p40</i> , της <i>IL2</i> , της <i>IL18</i> και της <i>iNOS</i> στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών	87
Διάγραμμα 7.8. Αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση της <i>iNOS</i> στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών. Στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	88
Διάγραμμα 7.9. Αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών. Στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	88
Διάγραμμα 7.10. Αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση της <i>iNOS</i> στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού έντερου ορνιθίων 42 ημερών. Στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	89
Διάγραμμα 7.11. Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στη γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IL10</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL18</i> και της <i>iNOS</i> στους	90



δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )	
Διάγραμμα 7.12. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού στη γονιδιακή έκφραση του <i>TGF-β4</i> , της <i>IL10</i> , της <i>IFN-γ</i> , της <i>IL18</i> και της <i>iNOS</i> στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών	90

<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>Σελίδα</b>
Εικόνα 1.1. Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης των εντεροκυττάρων μέσω της στενής σύνδεσης, των συνάψεων πρόσδεσης και του δεσμοσώματος (Τροποποίηση από Gilani <i>et al.</i> 2017)	5
Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση ενός τμήματος του τοιχώματος του εντέρου των πτηνών, που δείχνει τη δομή των λαχνών, την επιθηλιακή στοιβάδα και το υποκείμενο χόριο του βλεννογόνου, με τους διάφορους τύπους κυττάρων οι οποίοι βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές (Τροποποίηση από Perry 2006)	9
Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της σύστασης και της συγκέντρωσης της μικροχλωρίδας κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα ορνιθίων (Yeoman <i>et al.</i> 2012)	18
Εικόνα 2.4. Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης οργανικών οξέων	28
Εικόνα 5.5. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής ορνιθίων στις πειραματικές επεμβάσεις της 1 <sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης	40
Εικόνα 5.6. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής ορνιθίων στις πειραματικές επεμβάσεις της 2 <sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης	43
Εικόνα 5.7. Φωτογραφίες από διάφορες περιόδους των πειραματικών εκτροφών Α) Ορνίθια μιας ημέρας Β) Ορνίθια την 1η εβδομάδα ζωής Γ) Ορνίθια στην φάση πάχυνσης	
Εικόνα 5.8. Φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων Quawell	48
Εικόνα 5.9. Απεικόνιση ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2 %	49
Εικόνα 5.10. Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα ( <i>TGF-β4</i> )	52
Εικόνα 5.11. Καμπύλη τήξης του γονιδίου του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα ( <i>TGF-β4</i> )	53
Εικόνα 5.12. Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο οκλουδίνης ( <i>OCLN</i> )	55
Εικόνα 5.13. Καμπύλη τήξης για το γονίδιο της οκλουδίνης ( <i>OCLN</i> )	55

Εικόνα 5.14. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον πληθυσμό <i>Lactobacillus spp</i>	61
Εικόνα 5.15. Ανάπτυξη βακτηρίων του πληθυσμού <i>B. fragilis</i>	62
Εικόνα 5.16. Απεικόνιση βακτηρίων Α) <i>B. fragilis</i> Β) <i>C. perfringens</i> Γ) <i>C. clostridioforme</i> με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής DAPI	63

<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ</b>	Σελίδα
Βιογραφικό σημείωμα	144

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

TJ: Στενή σύνδεση

ZO: Zonula occludens

JAM: Συνδετικά μόρια πρόσδεσης

OCLN: Οκλουδίνη

CLDN: Κλαουδίνη

ΛΙΕ: Λεμφικός ιστός του εντέρου

TLR: Toll-like υποδοχέας (Toll-like receptor)

LTA: Λιποτειχοϊκό οξύ

LPS: Λιποπολυσακχαρίτης

IFN: Ιντερφερόνη

IL: Ιντερλευκίνη

CSF: Παράγοντας Διέγερση αποικιών

TGF: Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας

TNF: Παράγοντας νέκρωσης όγκων

Th: T-βοηθητικό λεμφοκύτταρο

Treg: Ρυθμιστικά T κύτταρα

NO: Μονοξείδιο του αζώτου

NKC: φυσικά κύτταρα-φονείς (Natural killer cells)

iNOS: Επαγόμενη συνθετάση του NO

NFKB1: Υπομονάδα 1 του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β

ΑΑΠ: Αντιμικροβιακοί αυξητικοί παράγοντες

AZB: Αύξηση ζώντος βάρους

ΚΤ: Κατανάλωση τροφής

ΣΕ: Συντελεστής εκμετάλλευσης

ΔΠΑ: Δείκτης παραγωγικής αποδοτικότητας

ΒΣ: Σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο

ΞΟ: Ξηρά ουσία

ΟΟ: Οργανική ουσία

ΛΟ: Λιπαρές ουσίες

ΑΟ: Αζωτούχες ουσίες

ΕΝΕΟ: Ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες

ΟΦΠ: Ολική φαινομένη πεπτικότητα

qPCR: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

## Γ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα εγκαθίσταται και αναπτύσσεται μέσω μιας συμβιωτικής σχέσης με τον ξενιστή. Η διαδικασία αυτή είναι κρίσιμη και πολύπλοκη με μακροπρόθεσμες συνέπειες στη διαμόρφωση της υγείας του ξενιστή. Στα πρώτα στάδια ζωής ενός ορνιθίου όλοι οι μικροοργανισμοί, έχουν ίσες ευκαιρίες να αποικίσουν τον γαστρεντερικό του σωλήνα (Thompson *et al.* 2008, Yin *et al.* 2010). Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο κέλυφος του αυγού και στο περιβάλλον εκκόλαψης προσλαμβάνονται αμέσως από τους νεοσσούς. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στα εντατικά συστήματα παραγωγής ο νεοσσός δεν έρχεται σε επαφή με τη μητέρα και άρα με μια φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα, η πιθανότητα να αποικιστούν οι βλεννογόνοι από παθογόνα μικρόβια είναι αυξημένη (Crhanova *et al.* 2011). Αργότερα, κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας η διαταραχή της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας αποτελεί συχνό φαινόμενο, λόγω διατροφικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, το οποίο έχει αρνητική επίπτωση στην αποδοτικότητα και την υγεία των ορνιθίων (Burkholder *et al.* 2008, Quinteiro-Filho *et al.* 2010, Yang *et al.* 2011, Rodríguez *et al.* 2012).

Ένα βασικό μέσο με το οποίο επιχειρείται η διατήρηση της ισορροπίας του εντερικού οικοσυστήματος και η διαφύλαξη της εντερικής υγείας είναι η διατροφή των ορνιθίων. Για πολλά χρόνια η χρησιμοποίηση των αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων (ΑΑΠ) ως πρόσθετα στο σιτηρέσιο των ορνιθίων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των ορνιθίων και την πρόληψη και τον έλεγχο των ασθενειών μέσω της επίδρασής τους σε παραμέτρους που επηρεάζουν τη δραστηριότητα της μικροβιακής χλωρίδας. Η απαγόρευση των ΑΑΠ έχει πολλαπλές επιπτώσεις στην εκτροφή των ορνιθίων (McEwen 2017), διότι δεν έχει βρεθεί εναλλακτική ουσία η οποία θα μπορούσε να αντικαταστήσει πλήρως από μόνη της τους ΑΑΠ. Επιπρόσθετα, η ελλιπής γνώση σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό μέσω του οποίου οι ΑΑΠ ενισχύουν την αποδοτικότητα της εκτροφής ορνιθίων (Niewold 2007) καθιστά την ανάπτυξη βιώσιμων εναλλακτικών λύσεων ένα περίπλοκο θέμα.

Η πολυπλοκότητα του γαστρεντερικού οικοσυστήματος, του οποίου η λειτουργία δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή έρχεται να προστεθεί στα παραπάνω αφού, η ομοιοστασία και η υγεία του εντέρου είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία αφορά τη μικρο- και μακρο- δομική του ακεραιότητα, την ισορροπία της μικροχλωρίδας και την κατάσταση του ανοσιακού συστήματος (Choct 2009).

Σε πλήθος εργασιών αναφέρεται ότι διάφορα βιοδραστικά συστατικά ενσωματωμένα στο σιτηρέσιο ορνιθίων, επηρεάζουν θετικά τα παραγωγικά τους χαρακτηριστικά (Abdel-Fattah *et*

al. 2008, Amerah et al. 2013, Aqeel Mohssen 2009, Chowdhury *et al.* 2009, Cowieson and Adeola 2005, Galib Al-Kassi and, Gutierrez- Fuentes et al. 2013, Kim et al. 2016, Mookiah et al. 2014, Zhang and Kim 2014). Τα συστατικά αυτά αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τα κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος ωφελώντας με αυτό τον τρόπο τις αποδόσεις των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Μέχρι και σήμερα όμως, η φύση των αλληλεπιδράσεων αυτών έχει προσδιοριστεί σε πολύ μικρό βαθμό (Pan and Yu 2014).

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη των παραγωγικών αποδόσεων και η αποτύπωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ συγκεκριμένων ειδών κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, του εντερικού επιθηλίου και της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας, κατά την προσθήκη βιοδραστικών ουσιών στο σιτηρέσιο ορνιθίων.

# Δ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

## 1. ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ

Ο κύριος σκοπός του εντερικού σωλήνα των ορνιθίων είναι η αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Παράλληλα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανοσιακού συστήματος αφού περιλαμβάνει το 70 % των ανοσοκυττάρων του οργανισμού (Kogut 2013). Επιπρόσθετα αποικίζεται από μια πολυσύνθετη και δυναμικά μεταβαλλόμενη μικροβιακή κοινότητα που περιλαμβάνει εκατοντάδες είδη βακτηρίων (Rehman *et al.* 2007).

Ο εντερικός σωλήνας ουσιαστικά αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό οικοσύστημα με τρία είδη κυττάρων τα οποία αναπτύσσουν αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις (Kogut 2013):

- (1) τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου με τις νευροενδοκρινικές συνδέσεις,
- (2) τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος
- (3) τα μικροβιακά κύτταρα που απαρτίζουν τη μικροχλωρίδα.

Η συμβολή του εντερικού σωλήνα στη διατήρηση της ομοιοστασίας είναι σημαντική και συνίσταται κυρίως στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής και στη δημιουργία ενός αποτελεσματικού εντερικού φραγμού. Ο φραγμός αυτός αποτρέπει την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών στον εντερικό βλεννογόνο, επιδεικνύοντας παράλληλα ανοχή σε συγκεκριμένα αντιγόνα (Kogut 2013). Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται άσκοπη δαπάνη ενέργειας και εξασφαλίζεται ανοσιακή ανοχή στα συστατικά της τροφής, που αλλιώς δεν θα ήταν δυνατόν να απορροφηθούν (Yegani and Korver 2008).

### 1.1 Εντερικός φραγμός

Η ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνου παίζει καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική δραστηριότητα του εντερικού σωλήνα. Η εντερική ακεραιότητα εξασφαλίζεται με τους ακόλουθους δύο τρόπους: Με την παραγωγή βλέννης από τα καλυκοειδή κύτταρα του εντέρου που καλύπτει όλο το εντερικό επιθήλιο, και με τη σύνδεση των εντεροκυττάρων μέσω της στενής σύνδεσης (TJ, tight junction; Chichlowski *et al.* 2007b).

### **1.1.1 Βλέννη**

Ένα στρώμα βλέννης καλύπτει το εντερικό επιθήλιο και σχηματίζει ένα φυσικό φραγμό μεταξύ της επιφάνειας του βλεννογόνου και του εντερικού χυμού, ελαχιστοποιώντας τόσο τη μικροβιακή μετατόπιση προς τον υποεπιθηλιακό ιστό όσο και την ενεργοποίηση της ανοσιακής αντίδρασης από τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς (Kogut and Arsenault 2016). Βασικό συστατικό της βλέννης αποτελούν οι βλεννίνες, οι οποίες έχουν αντιμικροβιακή δράση και συμβάλλουν στην προστασία του λεπτού εντέρου από τα γαστρικά υγρά του χυμού. Επιπροσθέτως, η βλέννη συνιστά ηθμό διήθησης, διαμέσου του οποίου ολοκληρώνεται η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής (Horn *et al.* 2009).

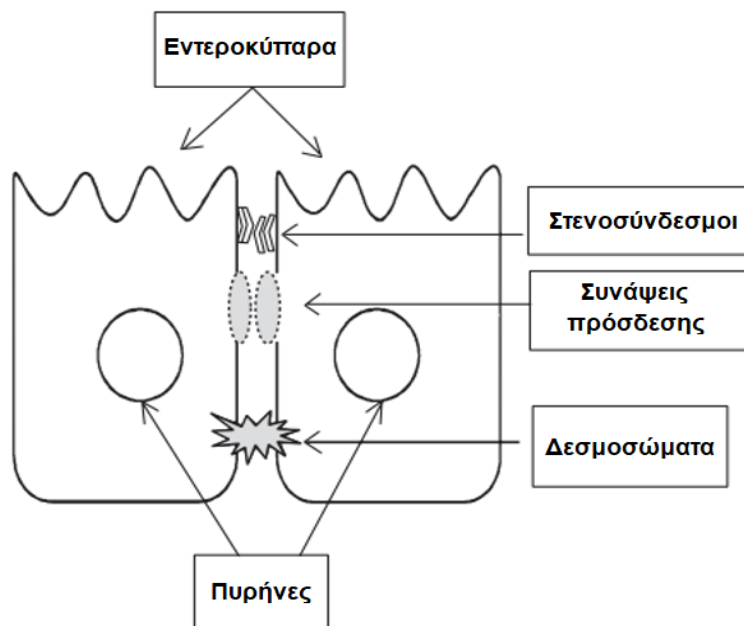
### **1.1.2 Στενή σύνδεση**

Η TJ, είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που βρίσκεται στις πλευρικές μεμβράνες κοντά στη παρυφή των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Lee 2015). Γενικά, οι TJs εκτός του ότι συγκρατούν τα κύτταρα του ίδιου ιστού μαζί δημιουργούν και διαύλους επιτρέποντας έτσι τη διάχυση ανάμεσα στα κύτταρα (Awad *et al.* 2017). Ουσιαστικά, οι TJs αποτελούν έναν μηχανικό ημιδιαπερατό φραγμό στην παρακυτταρική μεταφορά ιόντων, διαλυμένων ουσιών και ύδατος, καθώς και κυττάρων (Chiba *et al.* 2008). Η TJ δομείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι οι οκλουδίνες, οι κλαουδίνες, τα συναπτικά μόρια προσκόλλησης, η τρικελουίνη και οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες ικριώματος (intracellular scaffold proteins) όπως οι πρωτεΐνες zonula occludens (ZO, Wells *et al.* 2017). Οι οκλουδίνες και τα συναπτικά μόρια προσκόλλησης εμπλέκονται στη παρακυτταρική διαπερατότητα, ενώ οι κλαουδίνες οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των πρωτεϊνών ZO αποτελούν βασικούς παράγοντες στο σχηματισμό της TJ (Gilani *et al.* 2017).

### **1.1.3 Οκλουδίνη**

Η οκλουδίνη είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές των οποίων όταν η θέση μεταβάλλεται τροποποιείται η διαπερατότητα του επιθηλίου. Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ή φλεγμονής, η οκλουδίνη μετακινείται από την TJ προς το κυτταρόπλασμα, γεγονός το οποίο οδηγεί σε δυσλειτουργία του φραγμού (Awad *et al.* 2017).





**Εικόνα 1.1.** Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων μέσω της ΤΞ, των συνάψεων πρόσδεσης και του δεσμοσώματος (Τροποποίηση από Gilani *et al.* 2017)

#### 1.1.4 Κλαουδίνες

Η οικογένεια των κλαουδινών συνίσταται από τουλάχιστον 24 πρωτεΐνες στα θηλαστικά, και τα μέλη της είναι τα κύρια δομικά και λειτουργικά συστατικά της TJ (Lu *et al.* 2013). Όλες οι κλαουδίνες περιέχουν τέσσερις περιοχές, δύο εξωκυττάρειες περιοχές βρόχους και μία ενδοκυτταρική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Collins *et al.* 2012). Παρά τις δομικές ομοιότητές τους, οι κλαουδίνες εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες βάσει των οποίων διακρίνονται σε δύο τύπους: αυτές που εμπλέκονται στο σχηματισμό του φραγμού (μειώνοντας την παρακυτταρική διαπερατότητα) και σε αυτές που συμμετέχουν στο σχηματισμό των πόρων των διαύλων (αυξάνοντας την παρακυτταρική διαπερατότητα). Με βάση αυτή τη διάκριση, οι κλαουδίνες-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11 και -14 των θηλαστικών ανήκουν στην πρώτη κατηγορία ενώ οι κλαουδίνες-2, -7, -12 και -15, στη δεύτερη (Suzuki 2013).

Στα ορνίθια οι κλαουδίνες δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, όσον αφορά τη δομή τους και τη λειτουργία τους, ούτε έχει προσδιοριστεί αναλυτικά η γονιδιακή έκφραση των κλαουδινών στους διάφορους ιστούς. Σε πρόσφατη έρευνα στην οποία μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση

διαφόρων κλαουδινών σε έμβρυα ορνιθίων, αναφέρεται η ύπαρξη πλήθους κλαουδινών που αντίστοιχα ο ρόλος τους στα θηλαστικά αφορά το σχηματισμό του φραγμού. Ωστόσο στην εργασία αυτή αναφέρεται ότι δεν ανιχνεύτηκαν οι κλαουδίνες 6, 9 και 19 (Collins *et al.* 2013).

### 1.1.5 Zonula occludens πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες ZO, είναι περιφερειακές πρωτεΐνες που εντοπίζονται σε σημεία σύνδεσης. Οι ZO είναι πρωτεΐνες ικριώματος που προσελκύουν διάφορους τύπους πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της σύνδεσης. Βασικά, φέρουν ορισμένες περιοχές που απαιτούνται για τη δομική οργάνωση των διακυτταρικών συνδέσεων και άλλες περιοχές ικανές να λειτουργούν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων. Η πιο σημαντική όμως λειτουργία τους στη θέση σύνδεσης είναι η ρύθμιση του πολυμερισμού της κλαουδίνης σε επιθηλιακά κύτταρα (Bauer *et al.* 2010).

Οι πρωτεΐνες ZO περιλαμβάνουν τις ZO-1, -2, και -3 πρωτεΐνες. Η ZO-1 παίζει σημαντικότερο ρόλο στο σχηματισμό των TJs σε επιθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με τις ZO-2 και ZO-3. Αναλυτικότερα, η ZO-1 δρα ως ισχυρός δεσμός μεταξύ των TJs και του κυτταροσκελετού της ακτίνης και θεωρείται ότι είναι ένα λειτουργικά κρίσιμο συστατικό της TJ. Έχει επίσης βρεθεί ότι η ZO-1 αλληλεπιδρά με την οκλουδίνη ρυθμίζοντας την διαπερατότητα του επιθηλίου. Στα ορνίθια έχουν ταυτοποιηθεί και οι τρεις ZO πρωτεΐνες, αλλά δεν υπάρχουν αναφορές για την ZO-3.

Παρόλο που ο εντερικός φραγμός έχει διερευνηθεί εις βάθος στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά ζώα, είναι ένα σχετικά νέο αντικείμενο έρευνας στα ορνίθια κρεοπαραγωγής (Gilani *et al.* 2017).

Η έκφραση γονιδίων που κωδικεύουν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των TJs είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του εντερικού φραγμού (Πίνακας 1.1). Εργασίες στις οποίες μελετάται η έκφραση γονιδίων που κωδικεύουν πρωτεΐνες του εντερικού φραγμού σε ορνίθια κρεοπαραγωγής περιλαμβάνουν πειράματα υπό κανονικές συνθήκες (Rajput *et al.* 2013), παρουσία εντερικών παθογόνων (*Eimeria sp*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Clostridium perfringens type A*), παρουσία λιποπολυσακχαριτών ή παρουσία μυκοτοξινών (Liu *et al.* 2012, Osselaere *et al.* 2013, Chen *et al.* 2015, Wang *et al.* 2018). Οι περισσότερες μελέτες αφορούν πολυπαραγοντικά πειράματα στα οποία διερευνάται η προσθήκη ενζύμων (Liu *et al.* 2012), προβιοτικών (Li *et al.* 2015),

πολυσακχαριτών (Shao *et al.* 2013) και ιχνοστοιχείων (Zhang *et al.* 2012a) με σκοπό την τροποποίηση των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλούνται από την παρουσία μολυσματικών παραγόντων.

**Πίνακας 1.1.** Επίδραση πρόσθετων υλών ή / και παθογόνων στην έκφραση γονιδίων που κωδικεύουν πρωτεΐνες του εντερικού φραγμού σε ορνίθια κρεοπαραγωγής

Επέμβαση	Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων <sup>1</sup>	Βιβλιογραφία
Zn (0, 40, 80 and 120 mg/kg σιτηρεσίου)	CLDN1 ↑ OCLN ↑	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	CLDN1 ↓ OCLN ↓	
Ξυλανάση (5500 U/kg σιτηρεσίου)	CLDN1 ↑ OCLN ↑	Liu <i>et al.</i> (2012)
<i>Clostridium perfringens</i>	OCLN ↓	
<i>Saccharomyces boulardii</i> <sup>2</sup>	OCLN ↑ CLDN2 ↑ CLDN3 ↑	Rajput <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> B10 <sup>2</sup>	CLDN2 ↑ CLDN3 ↑	
<i>Escherichia coli</i> LPS <sup>3</sup>	CLDN2 ↑ ZO1 ↓	Li <i>et al.</i> (2015)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1 g/ kg σιτηρεσίου) × <i>Escherichia coli</i> LPS <sup>3</sup>	OCLN ↑ ZO1 ↑ CLDN2 ↑	
<i>Bacillus subtilis</i> στελέχος 1781	OCLN ↑	Gadde <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> στελέχη 1104 και 747	JAM2 ↑, OCLN ↑, ZO1 ↑	
<i>Bacillus subtilis</i> στελέχη 1781 και 747	JAM2 ↑, ZO1 ↑	

<sup>1</sup>↑: αύξηση γονιδιακής έκφρασης, ↓: μείωση γονιδιακής έκφρασης

<sup>2</sup>Σύγκριση με θετικό μάρτυρα (*virginiamycin*, 20 mg/kg)

<sup>3</sup>LPS: Λιποπολυσακχαρίτης

## 1.2 Ανοσιακό σύστημα του εντερικού βλεννογόνου

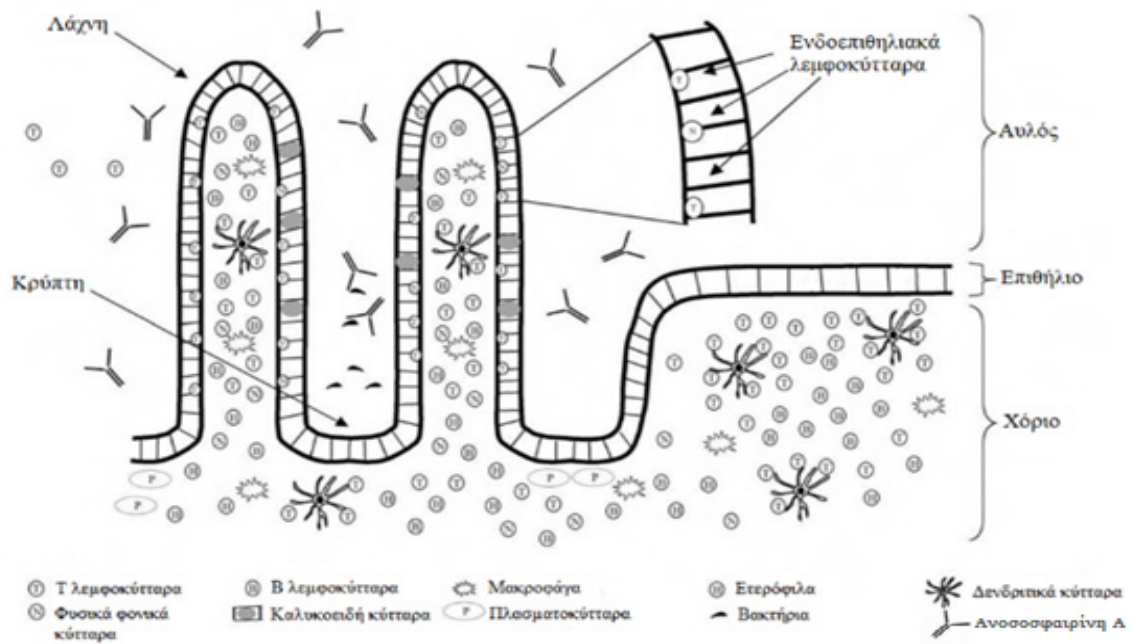
Στο πλαίσιο της αμυντικής του λειτουργίας το εντερικό σύστημα έχει, φυσικούς, χημικούς και κυτταρικούς φραγμούς, καθώς και εξειδικευμένα πρωτογενή και δευτερογενή λεμφικά όργανα (Perry 2006).

Ο λεμφικός ιστός του εντέρου (Gut-associated lymphoid tissue, ΛΙΕ) αποτελεί μέρος του λεμφικού ιστού των βλεννογόνων (Yegani and Korver 2008) και συνιστά έναν διακριτό κλάδο του ανοσιακού συστήματος που εκτιμάται ότι έχει περισσότερα λεμφοκύτταρα από τους άλλους λεμφικούς ιστούς (Εικόνα 1.2). Όπως ο σπλήνας, ο ΛΙΕ αποτελεί ένα σημαντικό σύστημα που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των ανοσιακών αποκρίσεων (Perry 2006). Αποτελείται από οργανωμένους ιστούς με μονά και / ή πολλαπλά λεμφοειδή θυλάκια καθώς και διάσπαρτα λεμφοκύτταρα στο υποκείμενο χόριο του βλεννογόνου (Brisbin 2008). Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου (δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα, ειλεός) είναι σχετικά φτωχό σε λεμφοειδή θυλάκια, αλλά υπάρχουν πολυάριθμα θυλάκια στο οπίσθιο τμήμα, ιδιαίτερα στα τυφλά έντερα (Yegani and Korver 2008).

Οι οργανωμένοι λεμφικοί ιστοί του εντέρου είναι α) οι δευτερογενείς λεμφικοί αδένες των τυφλών εντέρων (cecal tonsils), β) πλάκες του Peyer γ) ο θύλακος του Fabricius, δ) το εγκόλπωμα του Meckel και άλλες λεμφικές συναθροίσεις που βρίσκονται σε διάφορες θέσεις κατά μήκος του πεπτικού συστήματος (Brisbin *et al.* 2008).

Οι δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων, είναι μεγάλα λεμφοειδή συσσωματώματα που εντοπίζονται στη θέση σύνδεσης του τυφλού εντέρου με το κόλον, αποτελούνται από μια κεντρική κρύπτη, διάχυτους λεμφοειδείς ιστούς και βλαστικά κέντρα (Brisbin *et al.* 2008). Οι δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων των πτηνών θεωρούνται σημαντικοί καθώς πιθανολογείται να ελέγχουν την είσοδο βακτηρίων ή παθογόνων στα τυφλά έντερα (Setta *et al.* 2012).

Λόγω των παρόμοιων μορφολειτουργικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν οι δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων με τις τυπικές πλάκες του Peyer των θηλαστικών, έχει προταθεί ότι έχουν παρόμοιο ρόλο στα πτηνά. Ο θύλακος του Fabricius και το εγκόλπωμα του Meckel είναι μοναδικά για τα πτηνά. Ο θύλακος του Fabricius παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αντισωμάτων (Brisbin *et al.* 2008).



**Εικόνα 1.2.** Σχηματική απεικόνιση ενός τμήματος του τοιχώματος του εντέρου των πτηνών, στην οποία αποδίδεται η δομή των λαχνών, η επιθηλιακή στοιβάδα και το υποκείμενο χόριο του βλεννογόνου, με τους διάφορους τύπους κυττάρων οι οποίοι βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές (τροποποίηση από Perry 2006)

### 1.2.1 Αναγνώριση μικροβίων εντός του εντερικού σωλήνα - υποδοχείς Toll-like

Το εντερικό ανοσιακό σύστημα έχει τη δυνατότητα να ανέχεται μη βλαπτικούς για τον οργανισμό μικροοργανισμούς και ταυτόχρονα να καταστρέφει δυνητικά βλαπτικά μικροοργανισμούς. Η αναγνώριση των μικροοργανισμών γίνεται σε κυτταρικό επίπεδο από υποδοχείς της φυσικής ανοσίας, τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs), που εκφράζονται από τα επιθηλιακά και ανοσιακά κύτταρα του εντέρου. Οι PRRs αναγνωρίζουν εξελικτικά συντηρημένες δομές (Microbial Associated Molecular Patterns, MAMPs) που χαρακτηρίζουν μεγάλες κατηγορίες μικροοργανισμών. Κύριος εκπρόσωπος των PRRs είναι οι υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors – TLRs; Brisbin *et al.* 2008, St. Paul *et al.* 2013, Lowenthal *et al.* 2013). Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες αποτελούμενες από μία εξωκυττάρια περιοχή συγκροτούμενη από αμινοξικές επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη, μία διαμεμβρανική και μία κυτταροπλασματική περιοχή ανάλογη του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (St. Paul *et al.* 2013). Οι TLRs εντοπίζονται τόσο στην επιφάνεια του κυττάρου όσο και ενδοκυτταρικά. Γενικά, οι TLRs που εκφράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη

αναγνωρίζουν δομές από βακτήρια ή μύκητες, ενώ όσοι εκφράζονται ενδοκυτταρικά, εξειδικεύονται στην αναγνώριση νουκλεϊκών οξέων ιών ή βακτηρίων (Blasius and Beutler 2010). Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος των TLRs καταλήγουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. NF-κB) με αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργού οξυγόνου (ROI), ενδιάμεσων προϊόντων αζώτου (RNI) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών, και την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης συν-διεγερτικών μορίων. Σε συνέχεια των παραπάνω αποκρίσεων αρχίζει η δράση της επίκτητης ανοσίας (St. Paul *et al.* 2013; Werling and Jungi 2003).

Οι TLRs είναι ιδιαίτερα συντηρημένοι και υπάρχουν σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς (Keestra *et al.* 2013). Στην όρνιθα μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί 10 TLRs που περιλαμβάνουν τους TLR1A και TLR1B, TLR2A και TLR2B, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR15, και TLR21 (Geer *et al.* 2010).

Ο TLR2 αναγνωρίζει συστατικά μικροβιακών κυτταρικών τοιχωμάτων όπως οι πεπτιδογλυκάνες, τα λιποτειχοϊκά οξέα (LTAs) και οι λιποπρωτεΐνες από θετικά κατά Gram βακτήρια και οι λιποαραβινομαννάνες από μυκοβακτήρια και γλυκάνες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα ζυμών. Η ποικιλία των προσδετών του TLR2 είναι μεγαλύτερη μεταξύ όλων των TLRs (St. Paul *et al.* 2013). Ο TLR21 είναι λειτουργικό ορθόλογο του TLR9 των θηλαστικών και αναγνωρίζει τα CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια ενώ οι λιποπολυσακχαρίτες και η πρωτεΐνη φλαγγελίνη αναγνωρίζονται από τους TLR4 και TLR5, αντίστοιχα. Ο TLR3 φαίνεται να αναγνωρίζει το δίκλωνο RNA (dsRNA) με τρόπο παρόμοιο με αυτό των θηλαστικών και ο TLR15 ανιχνεύει πρωτεάσες ζύμης (Gupta *et al.* 2014). Οι διεγέρτες των TLRs παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1.2 (St. Paul *et al.* 2013).

Στα ορνίθια έχει αποδειχθεί ότι τα ετερόφιλα εκφράζουν μόνιμα τους TLR2A και TLR2B και ότι τα ετερόφιλα που έχουν απομονωθεί από νεοσσούς και εκτέθηκαν σε LTA υφίστανται οξειδωτική έκρηξη (St. Paul *et al.* 2013).

Ο TLR5 έχει θεμελιώδη ρόλο στη διαμόρφωση της έκβασης της μόλυνσης των ορνιθίων από *Salmonella typhimurium* αφού αποτρέπει την ενδοκυτταρική της εντόπιση (Iqbal *et al.* 2005).

**Πίνακας 1.2.** Υποδοχείς Toll-like (TLRs) που απαντούν στην όρνιθα (St. Paul *et al.* 2013)

TLRs	Δομή που αναγνωρίζεται	Διεγέρτης
TLR1A και B	Συστατικά βακτηριακού	Pam3CSK4, LTA
TLR2A και B	τοιχώματος	
TLR3	Δίκλωνο RNA	Poly I:C
TLR4	Συστατικά βακτηριακού τοιχώματος	Λιποπολυσακχαρίτες
TLR5	Βακτηριακή φλαγγελίνη/ μαστιγίνη	Φλαγγελίνη
TLR7	Μονόκλωνο RNA	Imiquimod, Resiquimod
TLR15	Πρωτεάσες που σχετίζονται με μικροβιακή πρόσδεση	Πρωτεάσες που παράγονται από <i>Candida guilliermondi</i>
TLR21	Θέσεις CpG στο DNA	Ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια CpG

### 1.2.2 Κυτταροκίνες

Ένα σημαντικό γνώρισμα του ανοσιακού συστήματος είναι η ικανότητα αλληλεπίδρασης διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών, η οποία επάγεται κυρίως μέσω των κυτταροκινών (Perry 2006). Οι κυτταροκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος, ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων (Wigley and Kaiser 2003). Οι κυτταροκίνες, ως επί το πλείστον, δεν εκκρίνονται συνεχόμενα, αλλά παράγονται ως αποτέλεσμα της ανοσιακής απάντησης σε αντιγόνα και σε κάθε είδους φλεγμονή. Ως ρυθμιστές των κυττάρων οι κυτταροκίνες χαρακτηρίζονται από υψηλή χημικοφυσική συγγένεια με ειδικούς επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς επάγοντας διάφορων τύπων κυτταρικές αντιδράσεις (Rahman and Eo 2012).

Οι κυτταροκίνες έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τη λειτουργία τους, τον τύπο των κυττάρων από τα οποία προέρχονται και από τον τύπο των κυττάρων στα οποία δρουν (Πίνακας 1.3) Οι κυτταροκίνες περιλαμβάνουν τις ιντερφερόνες (IFN), τις ιντερλευκίνες (ILs), τους παράγοντες διέγερσης αποικιών (CSFs), τους μετατρεπτικούς αυξητικούς παράγοντες (TGFs), τους παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNFs) και τις χημειοκίνες (Kaiser *et al.* 2005, Kaiser 2010). Παρόλο που, στην όρνιθα έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός κυτταροκινών μόνο μερικές από αυτές έχουν χαρακτηριστεί όσον αφορά τη λειτουργία και τη δομή τους (Rahman and Eo 2012).

**Πίνακας 1.3.** Κατηγοριοποίηση κυτταροκινών (*Rahman and Eo 2012*)

<b>Κυτταροκίνες</b>		
<b>Ιντερφερόνες</b>	Τύπος I	IFN-α, IFN- β, IFN-κ , IFN- ω.
	Τύπος II	IFN- γ
	Τύπος III	IFN- λ
<b>Ιντερλευκίνες</b>	Οικογένεια IL1	IL1 β, IL1RN, IL18, IL1F5
	Οικογένεια IL10	IL10, IL19, IL22, IL26
	Οικογένεια IL12	IL12, IL23
	Οικογένεια IL17	IL17A-D, IL17F
	T κύτταρα	IL2, IL15, IL21
	Οικογένεια Th2	IL4, IL5, IL1
	Άλλες	IL3, IL6, IL7, IL9, IL11, IL34
<b>Μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες</b>		TGF- β2, TGF- β3, TGF- β4
<b>Παράγοντες νέκρωσης όγκων</b>		OX40L, AITRL, FASL, VEGI, CD30L, CD40L, TRAIL, RANKL, BAFF, TRAIL-L
<b>Παράγοντες διέγερσης αποικιών</b>		CSF2, CSF3, CSF1
<b>Χημειοκίνες</b>	XCL	XCL1
	CCL	CCL1L1, CCL1L2, CCL3L1, CCL4L1, CCL5, CCL16, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL/MCP-L1, CCL/MCP-L2, CCL/MCP-L3
	CXCL	CXCL8a, CXCL8b, CXCL12, CXCL13a, CXCL13b, CXCL13c, XCL14, CXCL15
	CX3CL	CX3CL1

Η φυσική και η επίκτητη ανοσία επικαλύπτονται, αλληλεπιδρούν και συνεργάζονται αρμονικά μεταξύ τους για την επιτυχή έκβαση της άμυνας του οργανισμού έναντι παθογόνων. Ο συντονισμός μεταξύ τους γίνεται από τις κυτταροκίνες οι οποίες καθορίζουν τον τύπο, τη διάρκεια και την ένταση της απόκρισης (Rahman and Eo 2012, Wigley 2014). Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, δηλαδή οι κυτταροκίνες που προάγουν τη φλεγμονή (IL1b, IL6, CXCLi2 και CCLi2) έχουν ρόλο κλειδί στην έναρξη της φυσικής άνοσο-απόκρισης και



βοηθούν στη δημιουργία μιας τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Swaggerty *et al.* 2008). Αντίθετα, ο TGF-β4 έχει αντιφλεγμονώδη δράση, δηλαδή ελέγχει την απόκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επίσης, οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (Th1, Th2 και Th17) επάγουν, ενισχύουν ή ελέγχουν κύτταρα της φυσικής ανοσίας, τα οποία βοηθούν στην εκκαθάριση ή τον περιορισμό ενός παθογόνου. Τα Th1 που παράγουν κυρίως IFN-γ είναι σημαντικά για την ενδοκυτταρική ανοσία κατά των μικροοργανισμών. Ακολούθως, τα Th2 που παράγουν κυρίως IL4 και IL13 είναι σημαντικά για τα εξωκυττάρια παθογόνα συμπεριλαμβανομένων των ελμίνθων και των πρωτόζωων. Τέλος, τα εξωκυττάρια βακτηρία και οι μύκητες διεγείρουν τα Th17 που παράγουν κυρίως IL17A, IL17F και IL22. Επίσης, κυτταροκίνες όπως η IL10 παράγονται από ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg) τα οποία στοχεύουν να περιορίσουν την προ-φλεγμονώδη φύση της απόκρισης των Th και να ελαχιστοποιήσουν τη βλάβη των ιστών (Wigley and Kaiser 2003, Swaggerty *et al.* 2008, Kaiser 2010, Reid *et al.* 2016).

#### **1.2.2.1 Λειτουργία κυτταροκινών και iNOS**

Παρακάτω θα περιγραφεί η λειτουργία των κυτταροκινών TGF-β4, IL10, IFN-γ, IL18, IL12, IL2, IL22 και του iNOS που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

#### **Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας / TGF-β4**

Ο TGF-β εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα κύτταρων και ιστών και δρα ρυθμιστικά στην σύνθεση και τη δραστηριότητα άλλων κυτταροκινών (cytokine induced effect) (Brisbin *et al.* 2008). Τα Th3 παράγουν κυρίως TGF-β ως απάντηση στην παρουσία αντιγόνου. Υπάρχουν 3 ισομορφές του TGF-β στα πτηνά, η TGF-β4, TGF-β3 και TGF-β2 (Rahman and EO 2012). Ο TGF-β4 είναι αντίστοιχος με τον TGF-β1 των θηλαστικών αναφορικά με την αντιφλεγμονώδη του δράση. Παρόλα αυτά, ο ρόλος της ισομορφής TGF-β4 δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί *in vivo* στην όρνιθα (Waititu *et al.* 2014).

#### **Ιντερλευκίνη 10 (IL10)**

Στα θηλαστικά η IL-10 είναι κυτταροκίνη η οποία παράγεται από πάρα πολλά κύτταρα του ανοσιακού όπως μακροφάγα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, Th (1, 2, 17), Tregs και B κύτταρα αλλά και από επιθηλιακά κύτταρα. Η δράση της είναι αντιφλεγμονώδης και αφορά την αναστολή της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών, μορίων προσκόλλησης, καθώς και αντιγονοπαρουσιαστικών και συνδιεγερτικών μορίων από μονοκύτταρα / μακροφάγα, ουδετερόφιλα και T κύτταρα. (Masooma *et al.* 2012). Ο ρόλος της στην διατήρηση της ομοιοστασίας του εντέρου είναι βασικός και αυτό έχει αποδειχτεί σε ποντίκια στα οποία η αποσιωποποίηση της έκφρασης της *IL10* οδήγησε αυτόματα σε εντεροκολίτιδα (Shouval *et al.* 2014). Σύμφωνα, με τους Wu *et al.* (2016) η IL-10 διατηρεί την αντιφλεγμονώδη δράση της και στην όρνιθα.

### **Ιντερφερόνη-γ (IFN-γ)**

Η IFN-γ η οποία παράγεται κυρίως από τα Th και τα φυσικά κύτταρα-φονείς (NKC, natural killer cells) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των ενδοκυτταρίων μικροβίων. Η κύρια δράση της συνίσταται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων με σκοπό τη θανάτωση των φαγοκυτταρωθέντων μικροοργανισμών, επαγόμενη κυρίως από τις IL-12 και IL-18 (Göbel *et al.* 2003, Wigley and Kaiser 2003).

Εκτός από την δράση της επί ανοσοκυττάρων, μελέτες σε μοντέλα ποντικών που πάσχουν από κολίτιδα αναφέρουν ότι η IFN-γ δρώντας συνεργικά με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) ρυθμίζει αρνητικά τις ιδιότητες του φραγμού και την αυτοανανέωση του εντερικού επιθηλίου, ρυθμίζοντας έτσι την επιθηλιακή ομοιόσταση και επιδεινώνοντας τη φλεγμονή του βλεννογόνου (Nava *et al.* 2010).

### **IL18**

Μαζί με την IL-12, η IL18 διαδραματίζει μείζονα ρόλο στην παραγωγή της IFN-γ από T-κύτταρα και NKC και για αυτό έχει σημαντικό ρόλο στην Th1 απόκριση (Wang *et al.* 2015).

Απουσία όμως της IL12, η IL-18 παρουσιάζει χαρακτηριστικά άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών της οικογένειας IL1, όπως είναι η αύξηση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, η σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου (NO) και η παραγωγή χημειοκινών (Novick *et al.* 2013).

Αξιοσημείωτο είναι ότι στα ορνίθια εκτός από την επίδραση της IL18 στην παραγωγή της IFN-γ, η IL18 φαίνεται να προάγει και την παραγωγή της IL4 και άρα την Th2 απόκριση (Wang *et al.* 2015).

## **IL12**

Στα θηλαστικά, η IL12 συνδέεται με αμφίδρομη επαγωγική σχέση με τα Th1 κάτι που ισχύει και στην όρνιθα. Δομικά η IL12 της όρνιθας αποτελείται από 2 υπομονάδες, την IL12p35 και την IL12p40 (Degen *et al.* 2004).

## **IL2**

Η IL2 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων και των NKC (Gu *et al.* 2010).

## **IL22**

Η IL22 είναι μέλος της οικογένειας IL10 και επάγει προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αντιμικροβιακά πεπτίδια σε επιθηλιακά κύτταρα και ηπατοκύτταρα, αλλά όχι σε ανοσιακά κύτταρα (Kim *et al.* 2012).

## **iNOS**

Σε πολλούς οργανισμούς ένα από τα προϊόντα οξείδωσης της L-αργινίνης είναι το NO που εκτελεί ποικίλες και σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Στο ανοσιακό σύστημα το NO συντίθεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και δρα κυτταροτοξικά, αντι-ιικά και ως παράγοντας νέκρωσης όγκων και έχει αποδειχθεί ότι συνιστά έναν μη ειδικό ανοσιακό παράγοντα. Η σύνθεση του NO καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του NO. Υπάρχουν τρεις ισομορφές του συγκεκριμένου ενζύμου, η επαγωγίμη συνθετάση του NO (inducible synthetase NO, iNOS) είναι μία από αυτές και επάγεται από φλεγμονώδεις παράγοντες (Brujeni *et al.* 2008).

### **1.3 Εντερική μικροχλωρίδα**

Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων φιλοξενεί ένα δυναμικό σύνολο μικροβιακών πληθυσμών, την εντερική μικροχλωρίδα, το οποίο διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και υγεία του ξενιστή. Η συμβιωτική σχέση που αναπτύσσεται ανάμεσα στα ορνίθια και την εντερική τους μικροχλωρίδα, παρέχει ωφέλιμες επιδράσεις που περιλαμβάνουν την προαγωγή της ανάπτυξης του εντερικού βλεννογόνου, τον αποκλεισμό παθογόνων μικροοργανισμών, τη διάσπαση πολυσακχαριτών, την παροχή ενέργειας με τη μορφή αμινοξέων ή πτητικών λιπαρών οξέων και την προαγωγή της σωστής ανάπτυξης και ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος (Oakley and Kogut 2016). Ως εκ τούτου, η

μικροχλωρίδα αναγνωρίζεται ως ένα βασικό συστατικό του εντερικού οικοσυστήματος και αναφέρεται ως “ξεχασμένο όργανο” (O’Hara and Shanahan 2006).

### 1.3.1 Αποίκηση και κατανομή της μικροχλωρίδας στον εντερικό σωλήνα

Ο εντερικός σωλήνας των νεοσσών είναι στείρος κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης. Η αποίκηση του αποτελεί μια διαδικασία που αρχίζει κατά την έξοδο τους από το αυγό (Arajalahti 2005). Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο κέλυφος του αυγού και στο περιβάλλον εκκόλαψης προσλαμβάνονται αμέσως από τα νεαρά ορνίθια. Επομένως, ο αποικισμός των επιφανειών των βλεννογόνων είναι ουσιαστικά θέμα σύμπτωσης και σε ενδεχόμενη παρουσία παθογόνου ο στείρος εντερικός σωλήνας ίσως αποτελέσει ένα ιδανικό περιβάλλον αποικισμού και πολλαπλασιασμού (Crhanova *et al.* 2011).

Οι αερόβιοι καθώς και οι προαιρετικά αναερόβιοι βακτηριακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται πρώτοι. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί θεωρείται ότι μειώνουν το διαθέσιμο οξυγόνο που υπάρχει στον εντερικό σωλήνα, το οποίο επιτρέπει την επακόλουθη αποίκηση από αυστηρά αναερόβιους πληθυσμούς (Dibner *et al.* 2008).

Η κατανομή της μικροχλωρίδας στο γαστρεντερικό σωλήνα δεν αποτελεί μια τυχαία διαδικασία. Ποιοτικά καθώς και ποσοτικά οι διάφοροι βακτηριακοί πληθυσμοί οργανώνονται στα διαμήκη και στα κάθετα τμήματα του πεπτικού σωλήνα. Η διαμήκης οργάνωση της μικροχλωρίδας παραπέμπει στην κατανομή των βακτηρίων από τη στοματική κοιλότητα (ράμφος) προς το κόλον, με τη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών να διαφέρει σημαντικά από τμήμα σε τμήμα (Gong *et al.* 2007, Witzig *et al.* 2015, Stanley *et al.* 2015).

Η οριζόντια οργάνωση του εντερικού σωλήνα περιλαμβάνει διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα που σχηματίζονται εντός κάθε τμήματος του εντερικού σωλήνα τα οποία είναι: α) ο εντερικός χυμός, β) ένα παχύ στρώμα βλέννης που έρχεται σε επαφή με τον εντερικό αυλό και είναι εύκολο να διασκορπιστεί γ) ένα λεπτό στρώμα της βλέννης το οποίο είναι δύσκολο να αποκολληθεί και δ) η επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Dibner *et al.* 2008). Κάθε τμήμα και κάθε οριζόντιο στρώμα του εντερικού σωλήνα φιλοξενεί συγκεκριμένους βακτηριακούς πληθυσμούς το οποίο αποδίδεται κυρίως στους φυσικοχημικούς παράγοντες (χολικά άλατα, διαθέσιμο οξυγόνο, εντερικό pH) που επιδρούν σε κάθε ένα από αυτά.

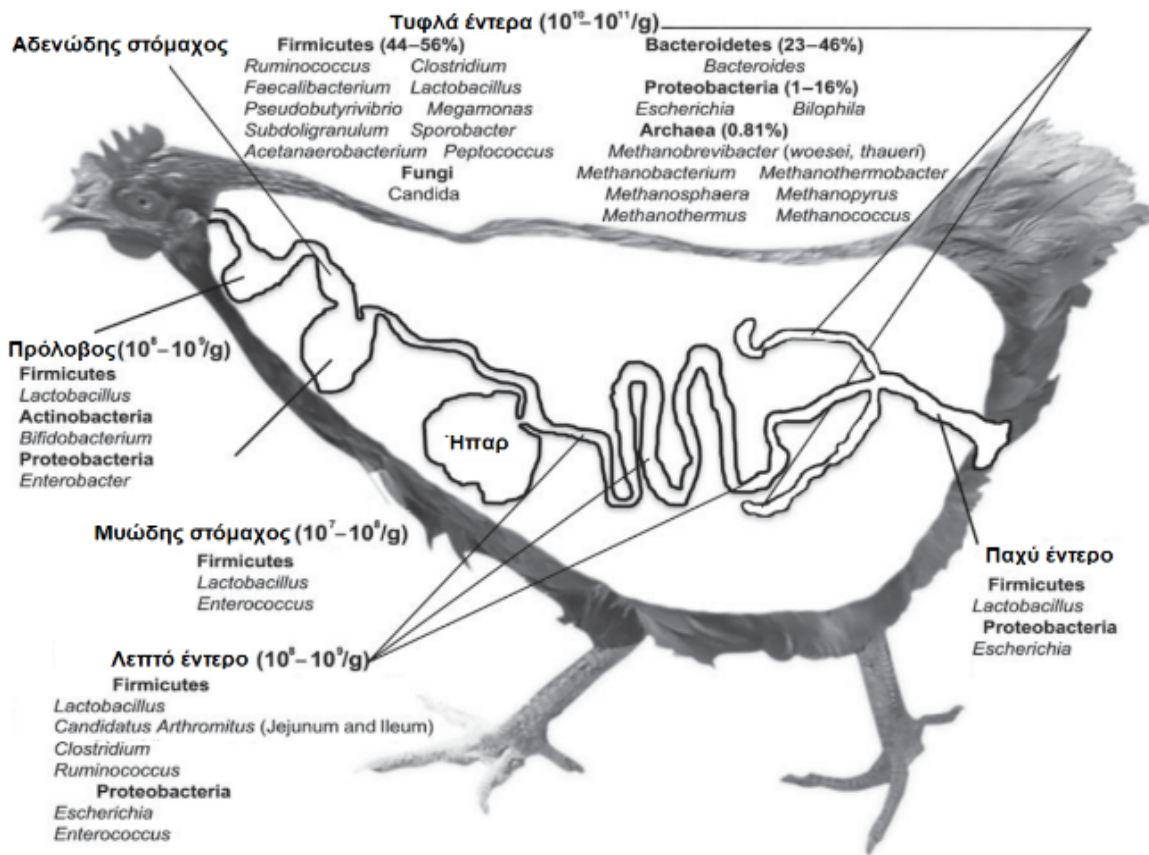
## **1.3.2 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα**

### **1.3.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας**

Η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας δεν είναι απόλυτη αλλά θεωρείται ως ένα δυναμικό σύστημα που μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος του υπό ανάπτυξη ζωικού πληθυσμού και τις συνθήκες που επιδρούν σε αυτόν. Διαφοροποιείται ανάλογα με τη φυλή, το φύλο (Mountzouris *et al.* 2015), το περιβάλλον εκτροφής, π.χ. την ποιότητα της στρωμνής (Cressman *et al.* 2010), την ατομικότητα (van Der Wielen *et al.* 2000), την ηλικία (Lu *et al.* 2003, Pourabedin *et al.* 2015, Ranjitkar *et al.* 2016) και τη διατροφή (Mountzouris *et al.* 2010, 2015, Tillman *et al.* 2011, Reinado *et al.* 2013, Mookiah *et al.* 2014, Corrigan *et al.* 2015). Η ηλικία καθώς και η διατροφή είναι δύο από τους παράγοντες που επηρεάζουν ιδιαίτερα τη φύση και το μέγεθος του μικροβιακού φορτίου που αποικίζει τον εντερικό σωλήνα, για αυτό και η παρακάτω ανάλυση αφορά κυρίως αυτούς τους δύο παράγοντες.

### **1.3.2.2 Διαφοροποίηση της σύστασης κατά μήκος του εντερικού σωλήνα**

Βακτηριακή δραστηριότητα υπάρχει σε όλο σχεδόν το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα αλλά εντοπίζεται κυρίως στο κατώτερο μέρος του (Εικόνα 1.3), στον ειλέο και στα τυφλά έντερα (Yeoman *et al.* 2012, Oakley and Kogut 2016). Σύμφωνα με τους Wang *et al.* (2016a), 14 βακτηριακά φύλα αποικίζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα ΓΣ (αδενώδης στόμαχος, μυώδης στόμαχος, δωδεκαδάκτυλος, νήστιδα, ειλέος, τυφλά έντερα και αμάρα), ορνιθίων 42 ημερών, με κυρίαρχα (>90 %) να είναι των Firmicutes, Bacteroidetes και Proteobacteria. Η παρουσία οξέων και χολικών αλάτων, ο υψηλός βαθμός απορροφητικής ικανότητας θρεπτικών συστατικών, η ταχεία διέλευση του περιεχομένου, η συνεχής ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων και της βλέννης και οι μηχανισμοί ανοσιακής άμυνας παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό βακτηριακών κυττάρων στον εγγύς εντερικό σωλήνα (Perry 2006).



**Εικόνα 1.3.** Σχηματική απεικόνιση της σύστασης και της συγκέντρωσης της μικροχλωρίδας κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα ορνιθίων (Yeoman *et al.* 2012)

### Ειλεός

Η συγκέντρωση της μικροχλωρίδας που αποικίζει τον ειλεό κυμαίνεται σε  $10^8$  -  $10^9$  κύτταρα / g περιεχομένου, (Olsen *et al.* 2008) με κυρίαρχο γένος να αποτελεί ο βακτηριακός πληθυσμός των *Lactobacillus* (Lu *et al.* 2003, Bjerrum *et al.* 2006, Wise and Siragusa 2006, Xiao *et al.* 2016). Σε πρόσφατη εργασία που διερεύνησε τη σύσταση της μικροχλωρίδας του περιεχομένου κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών, ανιχνεύτηκαν βακτήρια που ανήκουν στο φύλο Firmicutes σε ποσοστό 60 %, με κυρίαρχα γένη αυτά των *Lactobacillus* και *Enterococcus*, ενώ βακτήρια των φύλων Proteobacteria, Bacteroidetes και Actinobacteria ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό κάτω από 10 %. Επίσης, σύμφωνα με τους Ranjitkar *et al.* (2016), βακτήρια των οικογενειών *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae* και *Enterococaceae* προσδιορίστηκαν σε ποσοστά 61-73 %, 19 % και 1 % αντίστοιχα σε ορνίθια ηλικίας 36 ημερών. Ακόμα, σε έρευνα που διεξήγαγαν οι Lu *et al.* (2003) σε ορνίθια κρεοπαραγωγής που

χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο χωρίς τη προσθήκη αντιβιοτικών και κοκκιδιοστατικών, διαπίστωσαν ότι, από τους 614 16S rDNA κλώνους που ανιχνεύτηκαν στο περιεχόμενο ειλεού το 67,5 % απαρτίζονταν από βακτηριακούς πληθυσμούς του γένους *Lactobacillus*, το 9,69 % από είδη του γένους *Clostridium*, το 6,63 % και το 6,43 % από είδη των γενών *Streptococcus* και *Enterococcus* αντίστοιχα. Σε παρόμοια εργασία των Bjerrum *et al.* (2006), που σκοπό της είχε τη διερεύνηση της μικροχλωρίδας ορνιθίων, που είχαν διατραφεί με συμβατικό (προσθήκη σαλινομυκίνης και εξωγενών ενζύμων) ή με οργανικό σιτηρέσιο επιβεβαιώνεται η κυριαρχία του γένους *Lactobacillus* και τονίζεται ότι, τα είδη που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ήταν τα *L. salivarius* και *L. Johnsonni*, 44 % και 30 % των ολικών κλώνων των γαλακτοβακίλλων αντίστοιχα, στα συμβατικής διατροφής ορνίθια και τα *L. cripatus* και *L. salivarius*, 61 % και 20 % των ολικών κλώνων των γαλακτοβακίλλων αντίστοιχα, στα ορνίθια οργανικής διατροφής.

### **Τυφλό έντερο**

Τα τυφλά θεωρείται ότι προσφέρουν ένα αρκετά σταθερό περιβάλλον για την εγκατάσταση ενός σύνθετου μικροβιακού οικοσυστήματος (Zirgin *et al.* 2004). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην αργή ανανέωση του περιεχομένου του τυφλού εντέρου που έχει ως αποτέλεσμα να διατηρούνται σταθερές συνθήκες για την ευνοϊκή ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών (Mead 2005). Εκτιμάται ότι τουλάχιστον 700 διαφορετικά είδη που ανήκουν σε 140 διαφορετικά γένη ανευρίσκονται εντός των τυφλών εντέρων (Arajalahti *et al.* 2004)

Μελέτες επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου χρονολογούνται από τις αρχές του 1970 (Józefiak *et al.* 2004) παρόλα αυτά μέχρι και σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί πλήρως η ακριβής σύνθεση της πολύπλοκης αυτής μικροβιακής κοινότητας. Την τελευταία δεκαετία βέβαια, λόγω της ανάπτυξης μοριακών αναλυτικών τεχνικών που μπορούν να ανιχνεύουν βακτηριακούς πληθυσμούς σε σύνθετα οικοσυστήματα έχει σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα (Oviedo-Rondón 2009).

Κατά τις δεκατέσσερις πρώτες μέρες ζωής ενός υγιούς ορνιθίου η σύσταση της μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου είναι σχετικά απλή και αποτελείται από είδη που ανήκουν στα φύλα Firmicutes και γ-Proteobacteria. Αναλυτικότερα, μέχρι και τις τέσσερις πρώτες μέρες ζωής ενός ορνιθίου το είδος *E. coli* κυριαρχεί σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο, ενώ μετά τις 5 πρώτες μέρες μπορούν να ανιχνευτούν βακτήρια που ανήκουν στις οικογένειες *Lachnospiraceae* και *Clostridiaceae* (Tanikawa *et al.* 2011).

Αντιθέτως, τα τυφλά έντερα ενήλικων ορνιθίων αποικίζονται κυρίως από υποχρεωτικά αναερόβια και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, με τη συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται στο επίπεδο του  $10^{11}$  cfu / g εντερικού περιεχομένου. Το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηριακών πληθυσμών που ανιχνεύονται ανήκουν στο φύλο Firmicutes (Gong *et al.* 2002, Lu *et al.* 2003, Dumonceaux *et al.* 2006, Bjerrum *et al.* 2006, Cressman *et al.* 2010, Mohd Shaufi *et al.* 2015, Ranjitkar *et al.* 2016), ενώ δεν απουσιάζουν και βακτηριακά είδη που ανήκουν στα φύλα Bacteroidetes, Actinobacteria και Proteobacteria. Τα είδη που ανήκουν στην τάξη των *Clostridiales* (Firmicutes) και πιο συγκεκριμένα στο σύμπλεγμα των *Clostridium XIVa* (*C. coccoides* group) και *VI* (*C. leptum* group) υπερέχουν σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο βακτηριακό πληθυσμό (Πίνακας 1.4). Σύμφωνα με τους Lu *et al.* (2003), το 65,6 % από τους 619 κλώνους που ανιχνεύτηκαν στο τυφλό έντερο ορνιθίων ήταν ομόλογοι με τον πληθυσμό *Clostridiaceae* (*Clostridium*, *Ruminococcus* και *Eubacterium*), ακολούθησε, το γένος *Fusobacterium* με 13,9 % και εν συνεχεία το γένος των *Lactobacillus* σε ποσοστό 7,75 %, ενώ βακτηριακά είδη που ανήκουν στα φύλα Proteobacteria, Bacteroides και Actinobacteria ανιχνεύτηκαν μόλις σε ποσοστό 2,8 %, 5,1 % και 0 % αντίστοιχα.

Οι Zhu *et al.* (2002), οι οποίοι ανέλυσαν τον εντερικό χυμό καθώς και τη βλέννη που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο στο τυφλό έντερο θηλυκών ορνιθίων 42 ημερών αναφέρουν ότι, το 47,3 % των αλληλουχιών που απομονώθηκαν ανήκουν στα *C. leptum* και *C. coccoides*, ενώ επισημαίνουν ότι το 20,8 % αντιπροσωπεύεται από βακτηριακά είδη που ανήκουν στο φύλο *Proteobacteria*. Παρόμοια, οι Gong *et al.* (2007), οι οποίοι μελέτησαν βακτηριακούς πληθυσμούς που σχετίζονται με τη βλέννη του επιθηλίου του τυφλού εντέρου αναφέρουν ότι το γένος *Clostridium* αντιπροσωπεύει το 40 % των αλληλουχιών που ανίχνευσαν.

Όπως προαναφέρθηκε η σύσταση της μικροχλωρίδας δεν είναι απόλυτη και παραλλάσει ποικιλοτρόπως. Οι διαφορές στα ποσοστά των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών που παρατηρούνται παραπάνω αποδίδονται σε παράγοντες όπως, η μέθοδος ανάλυσης της μικροχλωρίδας (επιλογή εκκινητών, ευαισθησία μεθόδου, πρωτόκολλο απομόνωσης DNA, κλπ.), το περιβάλλον ανατροφής, το είδος της διατροφής και το γονότυπο του ορνιθίου καθώς και το τμήμα του εντέρου (διάμηκες ή κάθετο) που εξετάζεται.



**Πίνακας 1.4.** Ποσοστιαία αναλογία των κυριότερων βακτηριακών πληθυσμών στα τυφλά έντερα ορνιθίων

Βιβλιογραφία	Διατροφή	Ηλικία (ημέρες)	Μέθοδος	Αναλογία βακτηριακών πληθυσμών
Lu <i>et al.</i> 2003	Αραβόσιτος-σόγια	49	Αλληλούχιση του 16S rDNA	<i>Clostridium</i> 39,26%, <i>Ruminococcus</i> 16,48%, <i>Eubacterium</i> 9,85%, <i>Fusobacterium</i> 13,89%, <i>Lactobacillus</i> 7,75%, <i>Bacteroides</i> 5,01%
Zhu <i>et al.</i> 2002	Αραβόσιτος-σόγια, προσθήκη ζωικής πρωτεΐνης	42	Αλληλούχιση του 16S rDNA	<i>C. coccoides</i> 27,1%, <i>Sporomusa</i> 21,2%, <i>Enterics and relatives</i> 20,8%, <i>C. leptum</i> 20,2%, <i>Atopobium</i> 3,6%, <i>Bacillus - Lactobacillus - Streptococcus</i> 1,5%, <i>Actinomyces</i> 1,3%, <i>Bacteroides</i> 1,9%, <i>Pseudomonas</i> 0,7%.
Dumonceaux <i>et al.</i> 2006	Αραβόσιτος-σόγια	47	Chaperonin 60 species-specific qPCR	<i>Clostridiales</i> 68%, <i>Lactobacillales</i> 25%, <i>Bacteroidetes</i> 6%
Bjerrum <i>et al.</i> 2006	Σιτάρι, μπιζέλι, ελαιοκράμβη, σόγια, ιχθυέλαιο, συνθετικά αμινοξέα, εξωγενή ένζυμα (Ξυλανάση και ενδογλυκανάση, Σαλινομυκίνη).	40	Αλληλούχιση του 16S rDNA	<i>C. leptum</i> 62%, <i>Eubacterium</i> 15,5%, <i>Lactobacillus</i> 5%
	Σιτάρι, κριθάρι, πίτυρα σίτου, αραβόσιτος, βρώμη, ελαιοκράμβη, άλεσμα μηδικής, ιχθυέλαιο.			<i>C.leptum</i> 53%, <i>Eubacterium</i> 35,5%, <i>Lactobacillus</i> 8%
Gong <i>et al.</i> 2007	Σιτάρι-αραβόσιτος-σόγια	35	Αλληλούχιση του 16S rDNA	<i>Clostridia</i> 40%, <i>F. prausnitzii</i> 14%, <i>E.coli</i> 11%, <i>Lactobacillus spp</i> 7%, <i>Ruminococcus spp</i> 6%
Xiao <i>et al.</i> 2016	Εμπορικό σιτηρέσιο	42	Αλληλούχιση του 16S rDNA	<i>Firmicutes</i> 40%, <i>Bacteroides</i> >50%
Ranjitkar <i>et al.</i> 2016	Σιτάρι-αραβόσιτος-σόγια	36	Αλληλούχιση του 16S rDNA	<i>Lachnospiraceae</i> (22,7%), <i>Ruminococcaceae</i> (36,1%), <i>Lactobacillus</i> (3,3%), <i>Clostridiaceae</i> (4,8%), <i>Escherichia</i> (0,2%), <i>Alistipes</i> ( <i>Bacteroidetes</i> , 20,2%)

### 1.3.3 Ρόλος της μικροχλωρίδας

Γενικά, η εντερική μικροχλωρίδα παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη προαγωγή της υγείας του ξενιστή, αφού αποτελεί βασικό παράγοντα διατήρησης της ομοιοστασίας ενός οργανισμού. Στον άνθρωπο το μικροβίωμα του εντέρου επηρεάζει ουσιαστικά κάθε όργανο του σώματος αφού ρυθμίζει εκτός άλλων, την οστική μάζα, την ανάπτυξη του εγκεφάλου, τη συμπεριφορά, την ηπατική λειτουργία, το λιπώδη ιστό και το καρδιαγγειακό σύστημα (Al-Asmakh and Zadjali 2015).

Στην όρνιθα, η έρευνα για το ρόλο της εντερικής μικροχλωρίδας έχει εστιάσει περισσότερο σε θέματα που άπτονται της θρέψης, του μεταβολισμού και της ανοσίας. Περιληπτικά, τα οφέλη της συμβιωτικής σχέσης μικροχλωρίδας-ορνιθίου αφορούν την ενίσχυση της διαδικασίας της πέψης και της σύνθεσης συστατικών, την προαγωγή της ανάπτυξης του γαστρεντερικού σωλήνα, τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου, της ανοσιακής απόκρισης, την παραγωγή βιταμινών και την κατάληψη των θέσεων προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο (Rinttila and Arajalahti 2013). Τα παραπάνω αποδεικνύονται από έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε ζώα απαλλαγμένα μικροβίων όπου παρουσίασαν διευρυμένο τυφλό έντερο, λεπτότερο βλεννογόνο, μικρότερου ύψους λάχνες και κρύπτες, μειωμένη κινητικότητα εντέρου, μικρότερη θερμοκρασία σώματος και ανεπαρκώς ανεπτυγμένο ανοσιακό σύστημα (Niba *et al.* 2009). Επίσης, χρήσιμες πληροφορίες έχουν προκύψει από την χρήση προβιοτικών βακτηρίων *in vivo* και *in vitro* (Kozakova *et al.* 2015).

Ο μηχανισμός που οι βακτηριακοί πληθυσμοί επιδρούν στη φυσιολογία του ξενιστή παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Προς το παρόν αναφέρεται ότι η μικροχλωρίδα επηρεάζει τον ξενιστή μέσω της απευθείας επαφής με τα σωματικά κύτταρα ή μέσω διαλυτών ουσιών που παράγονται από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Pan and Yu 2014).

### 1.3.4 Συσχετισμός φυσιολογικής μικροχλωρίδας με παραγωγικά χαρακτηριστικά

Τα τελευταία χρόνια λόγω της εξέλιξης των μοριακών αναλυτικών τεχνικών διερεύνησης της μικροχλωρίδας (Oviedo-Rondón 2009), υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη συσχέτιση συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών με την απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Μεγαλύτερη ποικιλομορφία της βακτηριακή κοινότητας που αποικίζει τα τυφλά έντερα έχει συσχετιστεί με καλύτερο συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (Stanley *et al.* 2012). Σε πρόσφατη εργασία παρατηρήθηκε ότι βακτηριακά είδη που ανήκουν στις οικογένειες

*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, και *Erysipelotrichaceae* ανιχνεύτηκαν σε αφθονία στα τυφλά έντερα ορνιθίων με βελτιωμένο (χαμηλό) συντελεστή εκμετάλλευσης. Επίσης, βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Faecalibacterium* ήταν 20,1 φορές πιο πολλά σε ορνίθια με βελτιωμένο συντελεστή εκμετάλλευσης και μειωμένη κατανάλωση τροφής. Σε αντίθεση, είδη του γένους *Lactobacillus* συνδέθηκαν με αυξημένη κατανάλωση τροφής και συνεπώς αυξημένο συντελεστή εκμετάλλευσης (Stanley et al. 2016). Σε παρόμοια εργασία που μελέτησε τη σχέση ανάμεσα στο σωματικό βάρος ορνιθίων κρεοπαραγωγής και στη μικροχλωρίδα του προλόβου, του ειλεού και των τυφλών εντέρων, αναφέρεται αρνητική συσχέτιση του γένους *Streptococcus* και *Akkermansia* με το σωματικό βάρος και θετική με το γένος *Bifidobacterium* σε επίπεδο ειλεού. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της σχετικής αφθονίας του γένους *Lactococcus* με το σωματικό βάρος (Han et al. 2016).

### 1.3.5 Μεταβολική δραστηριότητα

Η μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας εντοπίζεται κυρίως στο τυφλό έντερο (αναερόβιο περιβάλλον, βραδεία ανανέωση του περιεχομένου και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών). Τα θρεπτικά συστατικά που ξεφεύγουν από τη πέψη και απορρόφηση στο λεπτό έντερο, οι εκκρίσεις του ξενιστή (π.χ. βλεννίνες) και τα αποβληθέντα επιθηλιακά κύτταρα μεταβολίζονται από τους μικροβιακούς πληθυσμούς ώστε να καλύψουν τις ανάγκες τους σε ενέργεια (Walter 2008) και άζωτο. Η ζυμωτική αντίδραση είναι παρόμοια με αυτή ενός φυτοφάγου ζώου και περιλαμβάνει υδρόλυση πολυσακχαριτών, ολιγοσακχαριτών, δισακχαριτών, άπεπτων πρωτεϊνών και λιπών καθώς και διάσπαση των ούρων, προερχόμενα από την αντιπερισταλτική κίνηση της αμάρας (Tellez et al. 2006).

Η α και β-γαλακτοσιδάση, η α και β-γλυκοσιδάση και η β-γλυκουρονιδάση είναι ένζυμα που παράγουν οι βακτηριακοί πληθυσμοί για να υδρολύουν μερικά από τα παραπάνω συστατικά (Mountzouris et al. 2007). Ανάλογα με το τύπο της υδρόλυσης (σακχαρόλυση ή πρωτεόλυση) που υφίστανται τα παραπάνω διαθέσιμα συστατικά διαμορφώνονται και τα τελικά προϊόντα. Μέσω της σακχαρόλυσης τα βακτήρια παράγουν κυρίως οργανικά οξέα όπως, γαλακτικό οξύ και λιπαρά οξέα μικρής αλύσου (οξικό, προπιονικό και βουτυρικό), ενώ μέσω της πρωτεόλυσης παράγουν διακλαδισμένα λιπαρά οξέα, αμμωνία αμίνες, ινδόλες και φαινόλες (Arajalahti 2005, Rehman et al. 2007).

Παρόλα αυτά, η βακτηριακή ζύμωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία λόγω της ποικιλομορφίας των ειδών και της μεταβολικής ικανότητας της μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου, όπου τα μεταβολικά τελικά προϊόντα ενός είδους μπορεί να χρησιμοποιούνται ως

ουσίες για να αναπτυχθεί ένα άλλο είδος, μηχανισμός γνωστός ως cross-feeding (Van Immerseel *et al.* 2006, Rehman *et al.* 2007).

Η σακχαρολυτική ζύμωση στο έντερο και σε προέκταση η παρουσία σακχαρολυτικών βακτηρίων (*Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) είναι περισσότερο επιθυμητή σε σχέση με την πρωτεολυτική, διότι η αμμωνία, οι φαινόλες και οι αμίνες που παράγονται από την πρωτεόλυση έχουν τοξική επίδραση και συνεπάγεται ενεργειακό κόστος για αποτοξίνωση. Αμμωνία παράγουν πρωτεολυτικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.* and *Bacteroides spp.* (Rehman *et al.* 2007). Αναλυτικότερα, η υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας σχετίζεται με μειωμένη ανάπτυξη του ζώου λόγω του ότι προκαλεί αυξημένη ανανέωση επιθηλιακών κυττάρων (Dibner and Richards 2005). Σε αντίθεση τα οργανικά οξέα που παράγονται από τα σακχαρολυτικά βακτήρια έχουν την τάση να μειώνουν το pH του περιεχομένου του εντέρου, φαινόμενο που σχετίζεται με την παρεμπόδιση παθογόνων βακτηρίων λόγω της ευαισθησίας τους να ανταπεξέλθουν σε όξινες συνθήκες (Van der Wielen *et al.* 2000; Arajalahti 2005). Ο μηχανισμός της βακτηριοστατικής τους δράσης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, θεωρείται όμως ότι διαχέονται ελεύθερα εγκαρσώς της βακτηριακής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου εκεί δίστανται μειώνοντας έτσι το pH με συνέπεια να προκαλείται εσωτερική καταστροφή (Van der Wielen *et al.* 2000). Η συνεισφορά τους στον οργανισμό εκτός από την παρεμπόδιση παθογόνων αφορά τόσο την ενεργειακή τροφοδοσία του οργανισμού, όσο και την διέγερση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Park *et al.* 2016), αυξάνοντας το μέγεθος των λαχνών (Thanh *et al.* 2009), που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορροφητικής του επιφάνειας. Συνεπώς, η επίδραση των μικρής αλύσου πτητικών λιπαρών οξέων στη λειτουργία του εντέρου είναι αδιαμφισβήτητη, ειδικά μετά από έρευνα που επισημάνει ότι επηρεάζουν το έντερο και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης (Yin *et al.* 2009).

## 2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ

Διατροφικές επεμβάσεις / διατροφικοί χειρισμοί με σκοπό την εγκατάσταση μίας ωφέλιμης μικροχλωρίδας ή την ρύθμιση της υπάρχουσας μικροχλωρίδας αποτελούν ένα βασικό εργαλείο για την προαγωγή της εντερικής υγείας και τη διατήρηση της ισορροπίας στο εντερικό οικοσύστημα. Η διαιτητική χορήγηση των ΑΑΠ για χρόνια αποτελούσε τη μοναδική επιλογή, με την απαγόρευσή τους όμως, εναλλακτικές πρόσθετες ουσίες, προβιοτικά (Mountzouris *et al.* 2007, Rajput *et al.* 2013, Mookiah *et al.* 2014), προβιοτικές βιοενεργές ουσίες (Silva *et al.* 2009, Wang *et al.* 2016b), συμβιωτικά (Awad *et al.* 2009, Mookiah *et al.* 2014, Dibaji *et al.* 2014), ένζυμα (Min *et al.* 2009, Shaw *et al.* 2010), οξιμιστές (Ao *et al.* 2009, Goodarzi Borojani *et al.* 2014, Pereira *et al.* 2015), βακτηριοσίνες (Kierończyk *et al.* 2017), αντιμικροβιακά πεπτίδια (Zhang and Sunkara 2014) και αντισώματα (Chalghoumi *et al.* 2009) είναι υπό διερεύνηση τόσο για την αποτελεσματικότητά τους όσο και για το τρόπο δράσης τους. Ωστόσο, η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματεύεται την επίδραση της προσθήκης οξιμιστών και προβιοτικών σε ορνίθια κρεοπαραγωγής και ως εκ τούτου η βιβλιογραφική ανασκόπηση θα εστιάσει σε αυτές τις πρόσθετες ύλες.

### 2.1 Αντιμικροβιακοί αυξητικοί παράγοντες

Η χρήση των αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων με σκοπό τη βελτίωση της αποδοτικότητας και την πρόληψη ασθενειών άρχισε τη δεκαετία του 1940 όταν παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη αποξηραμένων μυκηλίων του είδους *Streptomyces aureofaciens* (που περιείχαν υπολείμματα χλωρετρακυκλίνης) εκτός του αποτελεσματικού ελέγχου ασθενειών ενίσχυσε και την ανάπτυξη σε παραγωγικά ζώα (Fink-Gremmels 2012). Λίγο αργότερα, το 1951, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε τη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών ως πρόσθετων στην τροφή χωρίς κτηνιατρική συνταγή. Έκτοτε, η ενσωμάτωση των ΑΑΠ στην τροφή έγινε αναπόσπαστο μέρος της παραγωγής (Laxminarayan *et al.* 2015). Σύντομα το 1960, δημιουργήθηκαν σοβαρές ανησυχίες σε παγκόσμιο επίπεδο για την ασφάλεια των ΑΑΠ, όταν παρατηρήθηκε βακτηριακή αντοχή στην οξυτετρακυκλίνης σε ανθρώπους, η οποία μεταδόθηκε από το κρέας ζώων. Περιστατικά μικροβιακής αντοχής άρχισαν να αναφέρονται σε διάφορα μέρη του κόσμου και η χρήση των ΑΑΠ έγινε επίμαχο ζήτημα στα τέλη του 1990. Η Σουηδία ήταν η πρώτη χώρα που απαγόρευσε τη χρήση των ΑΑΠ το 1986, ενώ την 1η Ιανουαρίου του 2006 η Ευρωπαϊκή Ένωση κατήργησε τη χρήση τους (Suresh *et al.* 2018). Εκτός Ε.Ε. οι ΑΑΠ έχουν απαγορευτεί τελείως στη Νέα Ζηλανδία, εν μέρη στο Μεξικό

(εξαιρούνται avoparcin, vancomycin, bacitracin, tylosin, virginiamycin) ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έχει δώσει εθελοντικές κατευθυντήριες γραμμές στη βιομηχανία να αποσύρει τη χρήση των ΑΑΠ (Marshall and Levy 2011).

Αξιοσημείωτο να αναφερθεί είναι ότι, η ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν σε παραγωγικά ζώα στις ΗΠΑ το 2015 είναι 17 εκατομμύρια κιλά (σε σύγκριση με τα 4 εκατομμύρια που καταναλώθηκαν από ανθρώπους) εκ των οποίων μεγάλο μέρος ενσωματώθηκε στην τροφή παραγωγικών ζώων ως ΑΑΠ. Επίσης, αναμένεται ότι οι θάνατοι λόγω αντοχής στα αντιβιοτικά θα φτάσουν τα 10 εκατομμύρια /έτος το 2050 εάν η χρήση των αντιβιοτικών συνεχιστεί με τον ίδιο ρυθμό (Brüssow 2017).

### 2.1.1 Μηχανισμός δράσης των ΑΑΠ

Παρά την πολυετή χρήση των ΑΑΠ ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης τους. Για πολλά χρόνια θεωρείται ότι η θετική επίδραση των ΑΑΠ στην απόδοση των αγροτικών ζώων οφείλεται στο χαρακτηριστικό των αντιβιοτικών να δρουν αντιμικροβιακά (Knarreborg *et al.* 2002, Van Immerseel *et al.* 2006). Λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης, σε επίπεδο εντέρου, θεωρείται ότι παρεμποδίζουν υποκλινικές λοιμώξεις, μειώνουν μεταβολίτες που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την παραγωγικότητα (όπως τα τελικά προϊόντα της αποδόμησης της χολής), μειώνουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών σε παθογόνους μικροοργανισμούς και μειώνουν το πάχος του επιθηλιακού ιστού του εντέρου (Huyghebaert *et al.* 2011, Suresh *et al.* 2018).

Ωστόσο, ο Niewold (2007) πρότεινε ότι η ικανότητα των ΑΑΠ να προωθούν την ανάπτυξη οφείλεται στην αντιφλεγμονώδη δράση τους, η οποία αποτρέπει, την αύξηση του πάχους του εντέρου και γενικά εμποδίζει τη σπατάλη ενέργειας. Επίσης, ανέφερε ότι οι πιο αποδοτικοί ΑΑΠ, οι κυκλίνες και τα μακρολίδια, είναι αποδεδειγμένο ότι έχουν άμεση αντιφλεγμονώδη δράση τόσο *in vitro* (απουσία μικροβίων) όσο και *in vivo* (Niewold 2007).

Συνοψίζοντας, όσο συνεχίζει η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών (όπως η προσθήκη ΑΑΠ στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων) θα συνεχίσει να αυξάνεται ο κίνδυνος μικροβιακής αντοχής. Η ανάπτυξη βιώσιμων εναλλακτικών ουσιών έναντι των ΑΑΠ που θα έχουν ως στόχο τη διατήρηση της υγεία των ζώων, τη βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών, δεν θα έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη διαβίωση των ζώων και στην υγεία των καταναλωτών, είναι

πλέον απαραίτητη. Σημαντική συμβολή στο προσδιορισμό εναλλακτικών ουσιών θα δώσει η πλήρης κατανόηση του μηχανισμού των ΑΑΠ, διότι θα αναδείξει σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργία του εντερικού οικοσυστήματος.

## 2.2 Οξινιστές / Οργανικά οξέα

Η ενσωμάτωση των οξινιστών ως πρόσθετων στη διατροφή των ορνιθίων αποτελεί μία από τις εναλλακτικές λύσεις για την αντικατάσταση των ΑΑΠ. Οι οξινιστές οι οποίοι αποτελούνται από οργανικά ή ανόργανα οξέα ή τα άλατα τους έχουν λάβει ιδιαίτερης προσοχής από τους ερευνητές, λόγω της ικανότητας τους να δρουν αντιμικροβιακά. Η αντιμικροβιακή τους δράση είναι επί δεκαετίες αναγνωρισμένη για αυτό τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των ζωοτροφών και κυρίως για τη προστασία αυτών από μικροβιακές και μυκητιακές προσβολές αλλά και για την παράταση της συντηρητικής ικανότητας των ζωοτροφών που έχουν υποστεί τη διαδικασία της ενσίρωσης (Moon 1983).

Τα οργανικά οξέα είναι γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλείς ουσίες (Mani-López *et al.* 2012). Παρόλα αυτά η Ευρωπαϊκή Ένωση πρόσφατα άρχισε να εξετάζει εάν τα οργανικά οξέα είναι ασφαλείς ουσίες και αποτελεσματικές έτσι ώστε να εγκρίνει τη χρήση τους ως οξινιστές στην διατροφή των παραγωγικών ζώων (EFSA FEEDAP Panel 2014, 2015).

Όπως αναφέρεται από τους Khan and Iqbal (2016) οι πειραματικές μελέτες χρησιμοποιούν τα άλατα των οργανικών οξέων διότι κατέχουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα έναντι των απλών οργανικών οξέων, όπως το ότι, είναι άοσμα και ευκολότερα στο χειρισμό (στερεά και λιγότερο πτητικά) για τη διαδικασία παρασκευής ζωοτροφών.

Μέχρι σήμερα τα οργανικά οξέα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε απογαλακτισμένα χοιρίδια και έχουν δώσει παρόμοια αποτελέσματα με τους ΑΑΠ (Suiryanrayna and Ramana 2015).

**Πίνακας 2.5.** Χημικός τύπος και τιμές pKa των οργανικών οξέων που έχουν από 1-7 C

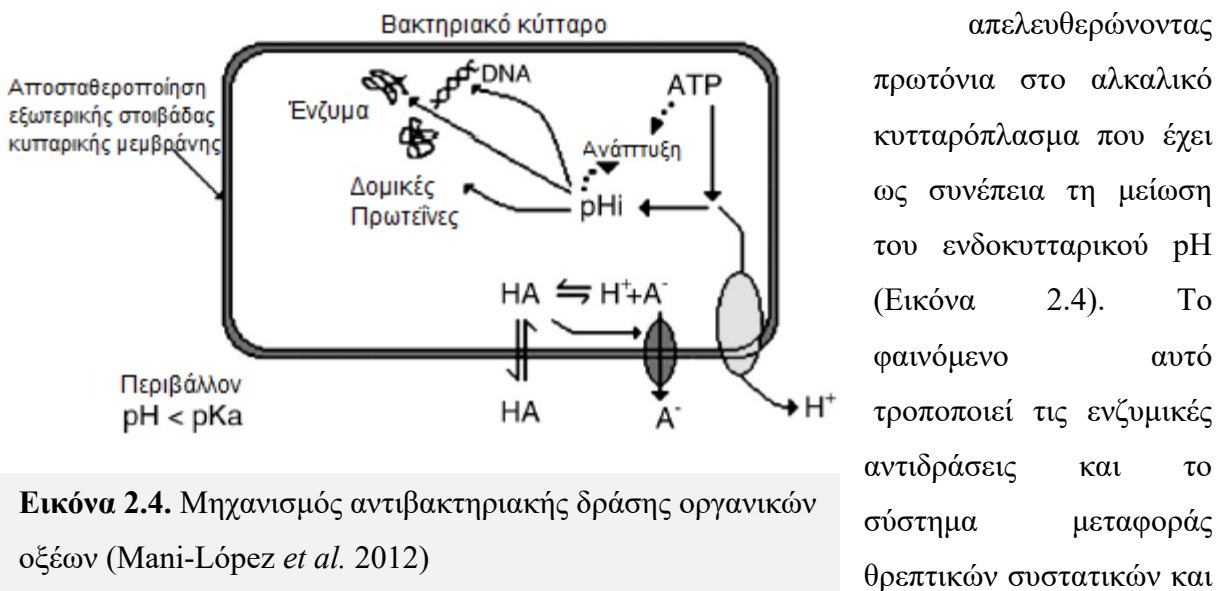
Όνομασία	Χημικός τύπος	pKa
Μυρμηκικό	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,77
Οξικό	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,76
Προπιονικό	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4,87
Βουτυρικό	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4,87
Γαλακτικό	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3,86
Μαλικό	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	3,40
Ταρταρικό	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	4,25
Κιτρικό	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	3,14
Βενζοϊκό	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4,20

### 2.2.1 Ορισμός, είδη και αντιβακτηριακή δράση οργανικών οξέων

Εκ της χημείας, ως οργανικό οξύ ορίζεται οποιοδήποτε οργανικό καρβοξυλικό οξύ (συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων και αμινοξέων) είναι της γενικής δομής R-COOH. Ωστόσο, δεν χαρακτηρίζονται όλα τα οργανικά οξέα από αντιμικροβιακή δράση, αλλά κυρίως τα απλά μονοκαρβοξυλικά (όπως το μυρμηκικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ) ή τα καρβοξυλικά που φέρουν μία ομάδα υδροξυλίου (όπως το γαλακτικό, το μηλικό, το τρυγικό και το κιτρικό) τα οποία είναι ασθενή οξέα και μόνο εν μέρει σε διάσταση και έχουν pKa (Πίνακας 2.5) που λαμβάνει τιμές από 3 έως 5.

Το φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης παραλλάσει ανάμεσα στα οξέα, για παράδειγμα το γαλακτικό οξύ είναι πιο αποτελεσματικό έναντι των βακτηρίων, ενώ το σορβικό οξύ έναντι των μυκήτων. Επιπρόσθετα, το μυρμηκικό και το προπιονικό έχουν ευρύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα και μπορούν να δράσουν κατά βακτηρίων και μυκήτων συμπεριλαμβανομένων και των ζυμομυκήτων (Dibner and Buttin 2002).

Η ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση των οργανικών οξέων οφείλεται αφενός στη μείωση του pH που προκαλούν στο περιβάλλον, το οποίο περιορίζει την ανάπτυξη βακτηρίων με μειωμένη ανθεκτικότητα σε όξινες συνθήκες και αφετέρου στο γεγονός του ότι στην αδιάστατη μορφή του ένα οργανικό οξύ μπορεί εύκολα να διαπεράσει τη λιπιδική μεμβράνη ενός βακτηρίου



**Εικόνα 2.4.** Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης οργανικών οξέων (Mani-López *et al.* 2012)

ωθει το βακτηριακό κύτταρο να χρησιμοποιήσει ενέργεια για την απελευθέρωση των πρωτονίων το οποίο προκαλεί ενδοκυτταρική συσσώρευση όξινων ανιόντων (Ricke 2003).



## 2.2.2 Μηχανισμός δράσης / Επιδράσεις των οξινιστών σε ορνίθια κρεοπαραγωγής

Αρκετές εργασίες αναφέρουν θετικές επιδράσεις της διαιτητικής προσθήκης των οξινιστών στην αποδοτικότητα (Abdel-Fattah *et al.* 2008, Galib Al-Kassi and Aqeel Mohssen 2009, Chowdhury *et al.* 2009, Dehghani-Tafti and Jahanian 2016) και στη πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών (Garcia *et al.* 2007, Ao *et al.* 2009) των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Τα θετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται θεωρείται ότι βασίζονται στην ικανότητα τους, να δρουν αντιμικροβιακά (άμεσα ή έμμεσα), να μειώνουν το pH του γαστρεντερικού περιεχομένου, να επηρεάζουν την μορφολογία του εντερικού επιθηλίου και να διαμορφώνουν την ανοσιακή απάντηση.

### Τροποποίηση της μικροχλωρίδας

*In vivo* μελέτες, αναφέρουν ότι οι οξινιστές μπορούν να τροποποιούν τη σύσταση της μικροχλωρίδας αυξάνοντας ωφέλιμους (Czerwiński *et al.* 2010, Hashemi *et al.* 2012, Sun *et al.* 2013) και μειώνοντας παθογόνους (Chaveerach *et al.* 2004, Fernandez-Rubio *et al.* 2009, Hassan *et al.* 2010) ή δυνητικά παθογόνους βακτηριακούς πληθυσμούς (Gunal *et al.* 2006, Pirgozliev *et al.* 2008). Γενικά, οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν αλλαγές που αφορούν κυρίως την αύξηση της συγκέντρωσης του γένους *Lactobacillus*, τη μείωση της συγκέντρωσης του είδους *E.coli* και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του γένους *Salmonella*, άρα την ενίσχυση των οξυ-άντοχων βακτηρίων και την παρεμπόδιση των ευαίσθητων στα οξέα βακτηρίων. Αναλυτικότερα, η προσθήκη μυρμηκικού αμμωνίου σε συγκέντρωση 3g / kg τροφής επέφερε μείωση στη συγκέντρωση του είδους *E.coli* στο εντερικό περιεχόμενο (Paul *et al.* 2007). Επίσης, αύξηση της συγκέντρωσης των πληθυσμών *Lactobacillus* / *Enterococcus* σημειώθηκε μετά από ενσωμάτωση ενός εμπορικού οξινιστή που περιείχε φουμαρικό οξύ, μυρμηκικό ασβέστιο, προπιονικό ασβέστιο και σορβικό κάλιο, προστατευμένο (coated) με φυτικά τριγλυκερίδια (Czerwiński *et al.* 2010). Επιπρόσθετα, μείωση στα επίπεδα του είδους *E.coli* στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων και αύξηση στη συγκέντρωση του γένους *Lactobacillus* στα τυφλά έντερα παρατηρήθηκε μετά την προσθήκη 80 g / kg ζυμωμένου βαμβακόσπορου (Sun *et al.* 2013). Ακόμα, οι Nava *et al.* (2009) αναφέρουν αύξηση στη συγκέντρωση του *Lactobacillus* στο ειλεακό περιεχόμενο μετά από προσθήκη οξινιστή ο οποίος περιείχε DL-2-υδροξύ-4(μεθυλθειο) βουτυρικό οξύ, μυρμηκικό και προπιονικό. Τέλος, η εισαγωγή μυρμηκικού ή δι-μυρμηκικού καλίου σε συγκέντρωση 0,5 % της τροφής μηδένισε την εμφάνιση του γένους *Salmonella* στο τυφλό έντερο ορνιθίων 35 ημερών σε σύγκριση με τα ορνίθια του μάρτυρα που ανιχνεύτηκε το γένος *Salmonella* στο 1/3 των δειγμάτων (Ragaa and Korany 2016).

### Μείωση του pH του γαστρεντερικού περιεχομένου

Όπως προαναφέρθηκε ένας από τους μηχανισμούς δράσης των οξινιστών αποτελεί η μείωση του pH του περιεχομένου του γαστρεντερικού συστήματος, που εκτός του ότι μπορεί να αποτελέσει έναν έμμεσο αντιμικροβιακό μηχανισμό, παράλληλα όπως αναφέρεται από τους Dibner and Buttin (2002) είναι δυνατό να αυξήσει την ενεργότητα του πεψινογόνου, των ζυμογόνων και άλλων ενζύμων (π.χ μικροβιακής φυτάσης).

Μείωση του pH του εντερικού περιεχομένου έχει αναφερθεί σε εργασίες μετά από τη προσθήκη, βουτυρικού 0,4 ή 0,6 % (Panda *et al.* 2009), 0,5 % μυρμηκικού ή 0,5 % δι-φορμικού καλίου (Ragaa and Korany 2016), 0,25 % ή 0,50 % ή 1 % φορμικού οξέος ή 0,5 %, ή 1 % , ή 1,5 % φουμαρικού οξέος ή 0,25 %, ή 0,50 %, ή 0,75 % οξικού οξέος ή 1 %, ή 2 %, ή 3 % κιτρικού οξέος (Ghazalah *et al.* 2011), βενζοϊκού οξέος σε συγκέντρωση 2 g/kg τροφής (Olukosi and Dono 2014) και βενζοϊκού οξέος σε συγκέντρωση 300 ή 1000 mg/kg τροφής (Giannenas *et al.* 2014).

### Επίδραση στη μορφολογία βλεννογόνου

Οι οξινιστές φαίνεται να επιδρούν άμεσα στην μορφολογία του εντερικού σωλήνα, το οποίο ίσως να διευκολύνει την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών. Σύμφωνα με τους Adil *et al.* (2010), το ύψος των λαχνών του δωδεκαδακτύλου αυξήθηκε μετά από την χορήγηση 3 % βουτυρικού οξέος ή 3 % φουμαρικού οξέος ή 3 % γαλακτικού οξέος. Επιπρόσθετα το ύψος των λαχνών της νήστιδας αυξήθηκε μετά την εισαγωγή 2 % βουτυρικού ή 3 % βουτυρικού ή 2 % φουμαρικού, 2 % ή γαλακτικού οξέος ή 3 % γαλακτικού οξέος (Adil *et al.* 2010). Ακόμα, η προσθήκη εμπορικού οξινιστή ο οποίος περιείχε μυρμηκικό οξύ, μυρμηκικό αμμώνιο, προπιονικό οξύ και προπιονικό αμμώνιο συντέλεσε στην αύξηση του πλάτους των λαχνών στον ειλέο (Senkoylu *et al.* 2007). Επίσης, σημειώθηκε αύξηση του ύψους των λαχνών, του βάθους των κρυπτών και του πλάτους του μυϊκού χιτώνα στη νήστιδα μετά την προσθήκη εμπορικού οξινιστή σε συγκέντρωση 1g / kg που περιείχε φουμαρικό οξύ, μυρμηκικό ασβέστιο, προπιονικό ασβέστιο και σορβικό κάλιο προστατευμένα από τρυγλυκερίδια (Smulikowska *et al.* 2009). Σε μία άλλη εργασία η προσθήκη βουτυρικού σε συγκεντρώσεις 0,2 ή 0,4 ή 0,6 % οδήγησε σε αύξηση του ύψους των λαχνών και του βάθους των κρυπτών (Panda *et al.* 2009). Τέλος, αύξηση του πλάτους, του ύψους και της περιοχής των λαχνών στο δωδεκαδάκτυλο, στη νήστιδα και στον ειλέο έχει παρατηρηθεί από την ενσωμάτωση οξινιστή (μίγμα από βουτυρικό ασβέστιο, προπιονικό ασβέστιο, γαλακτικό ασβέστιο, μυρμηκικό ασβέστιο) και αιθέριου ελαίου σε ποσοστό 0,79 % (Kum *et al.* 2010).

### Βελτίωση της ανοσιακής απάντησης

Η επίδραση των οξινιστών στο ανοσιακό σύστημα δεν έχει μελετηθεί εις βάθος στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, ωστόσο φαίνεται η διαιτητική χορήγηση οξινιστών να διεγείρει την φυσική και την επίκτητη ανοσιακή απάντηση. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη κιτρικού οξέος σε ποσοστό 0,5 % είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας των ανοσοκυττάρων στο χόριο του βλεννογόνου και στον υποβλεννογόνο ιστό των τυφλών εντέρων και του ειλεού και επίσης στον φλοιό και το μυελό των θυλακίων του θύλακα Fabricius (Chowdhury *et al.* 2009). Σε παρόμοια εργασία, στην οποία χρησιμοποιήθηκε κιτρικό οξύ στην ίδια δοσολογία παρατηρήθηκε αύξηση της πυκνότητας των λεμφοκυττάρων στα λεμφικά όργανα (δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων, θύλακας του Fabricius, ειλεός) προτείνοντας την ενίσχυση της φυσικής ανοσίας (Haque *et al.* 2010). Επίσης, σύμφωνα με τους Abdel-Fattah *et al.* (2008) και Ghazala *et al.* (2011) τα ορνίθια που κατανάλωσαν οξινιστές είχαν βαρύτερα ανοσιακά όργανα (θύλακος του Fabricius and θύμος αδένας) και επίσης υψηλότερα επίπεδα σφαιρίνης στον ορό του αίματος. Επιπρόσθετα, η ενσωμάτωση οξινιστή σε συγκέντρωση 1,5 g / kg τροφής είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στο τίτλο των αντισωμάτων έναντι της ασθένειας Newcastle σε ορνίθια κρεοπαραγωγής ηλικίας 21 ημερών (Houshmand *et al.* 2012). Επιπλέον, αύξηση στον τίτλο των αντισωμάτων έναντι της ασθένειας Newcastle και σε αιμοποιητικά κύτταρα του προβάτου, στο βάρος του θύμου αδένος, στην έκταση του βλαστικού κέντρου του σπλήνα σε ορνίθια 35 ημερών που κατανάλωσαν βουτυρικό νάτριο σε συγκέντρωση 1g / kg τροφής (Sikandar *et al.* 2017). Τέλος, η ενσωμάτωση εκχυλίσματος από Ιαπωνική βερικοκιά (το οποίο περιείχε ποικίλες πολυφαινόλες και οργανικά οξέα όπως, μαλικό οξύ, κιτρικό οξύ, προπιονικό οξύ και γαλακτικό οξύ) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των κυτταροκινών *IL-1β* και *IL-6* στο σπλήνα, ένα δευτερογενές λεμφικό όργανο το οποίο διεγείρει την επίκτητη ανοσιακή απάντηση (Jang *et al.* 2013).

Παρόλο που αρκετές εργασίες αναφέρουν θετικά αποτελέσματα της χρήσης των οξινιστών όσον αφορά βασικές παραμέτρους ανάπτυξης, ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που είτε δεν παρατήρησαν επιδράσεις (Gunal *et al.* 2006, Houshmand *et al.* 2012) ή παρατήρησαν αρνητικές επιδράσεις (Biggs and Parsons 2008). Τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις πειραματικές εργασίες ίσως να οφείλονται σε παράγοντες όπως η χημική δομή του οξέος, η pKa του οξέος, τα χαρακτηριστικά του οξέος (εστεροποιημένη μορφή ή μη εστεροποιημένη, οξύ ή άλας, επικαλυμμένο ή μη επικαλυμμένο), το μοριακό βάρος του οξέος, η ρυθμιστική ικανότητα της τροφής, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του οξέος έναντι μικροοργανισμών και η υγιεινή της πειραματικής εκτροφής (Dibner and Buttin 2002,

Paratsiros *et al.* 2012, Polycarpo *et al.* 2017). Συνεπώς, περαιτέρω πειραματικές εργασίες χρειάζονται για να διερευνηθούν εις βάθος οι επιδράσεις που δημιουργούν τα διάφορα είδη οξιμιστών όταν προστίθενται μεμονωμένα σε συνδυασμό με άλλους οξιμιστές ή με άλλα πρόσθετα.

## 2.3 Προβιοτικά

Η χρήση των προβιοτικών είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη ως πρόσθετα, στη διατροφή των ζώων, σε φαρμακευτικά σκευάσματα, σε γαλακτοκομικά προϊόντα ακόμα και σε προϊόντα κρέατος (Musa *et al.* 2009). Βασικά αποτελεί ένα αναπτυσσόμενο πεδίο στην επιστήμη, στη φαρμακευτική αλλά και στη βιομηχανία.

### 2.3.1 Ορισμός και κριτήρια επιλογής

Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας ορίζει ότι τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες, ωφελούν την υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO 2006).

Για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός θα πρέπει να κατέχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και να πληροί και συγκεκριμένα κριτήρια ασφάλειας, τα οποία περιλαμβάνουν τα εξής (Gaggia *et al.* 2010):

- Να μην είναι τοξικός
- Να μην είναι παθογόνος
- Να έχει προέλευση από τον ξενιστή
- Να επιζεί, να αποικίζει και να είναι μεταβολικά ενεργός στη θέση στόχο, που συνεπάγεται να είναι ανθεκτικό στη γαστρική οξύτητα και στα χολικά άλατα, να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο ή στη βλέννη και να ανταγωνίζεται με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα.
- Να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες
- Να ανταγωνίζεται παθογόνα βακτήρια
- Να ρυθμίζει την ανοσιακή απάντηση
- Να είναι ικανός να ασκεί ένα τουλάχιστον επιστημονικά υποστηριζόμενο χαρακτηριστικό για την προαγωγή της υγείας

- Να είναι γενετικά σταθερός
- Να διατηρεί σταθερά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και διανομή
- Να διατηρεί τη βιωσιμότητά του σε υψηλούς πληθυσμούς
- Να έχει επιθυμητά οργανοληπτικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά όταν επιδέχεται βιομηχανική κατεργασία

### **2.3.2 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών**

Ο μηχανισμός που τα προβιοτικά δρουν και επιτυγχάνουν τη διατήρηση της ωφέλιμης μικροχλωρίδας δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Παρόλα αυτά αναφέρεται ότι επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του εντερικού σωλήνα σε τρία διαφορετικά επίπεδα, επιδρώντας: α) στο περιβάλλον του εντερικού χυμού, β) στη λειτουργία του επιθηλιακού και βλεννογόνιου φραγμού και γ) στο ανοσιακό σύστημα (Ng *et al.* 2009). Αναλυτικότερα τα προβιοτικά :

- ❖ ασκούν αντιμικροβιακή δράση
- ❖ ενισχύουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού
- ❖ ρυθμίζουν την ανοσιακή απάντηση

#### **2.3.2.1 Αντιμικροβιακή δράση**

Τα προβιοτικά τροποποιούν το εντερικό περιβάλλον με τέτοιο τρόπο που τα παθογόνα βακτήρια αδυνατούν να επιζήσουν. Η τροποποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω: α) της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών (οργανικών οξέων και βακτηριοσινών), β) του ανταγωνισμού για θέσεις προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο και γ) του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά.

## **A. Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών**

### **Βακτηριοσίνες**

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικές ουσίες που παράγονται από τα βακτήρια, με σκοπό να παρεμποδίσουν την αύξηση άλλων βακτηρίων. Δεν δρουν όπως τα αντιβιοτικά και διαφέρουν σε κρίσιμα σημεία που τις διαφοροποιούν, όπως του ότι είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια (Salminen and Wright 2004). Τα Gram-θετικά βακτήρια παράγουν πολλές βακτηριοσίνες οι οποίες είναι διαφόρων μεγεθών, έχουν ποικίλη δομή και κατέχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, ενώ έχουν μεγάλο αντιμικροβιακό φάσμα (Yang *et al.* 2014). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Perez *et al.* 2014). Οξυγαλακτικά βακτήρια απομονωμένα από το εντερικό σύστημα ορνιθίων παράγουν βακτηριοσίνες που παρουσιάζουν παρεμποδιστική δράση έναντι παθογόνων όπως, τα *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και *Campylobacter jejuni* (Stern *et al.* 2006, Shin *et al.* 2008).

### **Οργανικά οξέα**

Τα οργανικά οξέα, όπως το οξικό, το βουτυρικό, το προπιονικό και το γαλακτικό οξύ, είναι τελικά προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων και είναι γνωστό ότι κατέχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η προσθήκη προβιοτικών στα σιτηρέσια των παχυνόμενων ορνιθίων συνεισφέρει στην αύξηση της παραγωγής των πτητικών λιπαρών οξέων στον εντερικό σωλήνα (Peng *et al.* 2016, Wang *et al.* 2017) ή στην τροποποίηση της αναλογίας τους (Mountzouris *et al.* 2015). Εικάζεται ότι τα πτητικά λιπαρά οξέα στο περιβάλλον του εντέρου συμβάλουν στην παρεμπόδιση πολλών βακτηρίων περικλειόμενων και των Gram-αρνητικών παθογόνων (Van Immerseel *et al.* 2006).

## **B. Ανταγωνισμός για θέσεις προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο**

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό πολλών μικροοργανισμών, παθογόνων και ωφέλιμων, είναι η ικανότητα της προσκόλλησης τους στα απορροφητικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (θέσεις προσκόλλησης). Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγουν την απομάκρυνση τους μέσω της περισταλσης του εντέρου και επιτυγχάνουν να παραμείνουν στον εντερικό σωλήνα (Ewing and Cole 1994). Η προσκόλληση των παθογόνων στο εντερικό επιθήλιο μπορεί να οδηγήσει στην

είσοδο τους στον οργανισμό του ξενιστή. Για παράδειγμα μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η σαλμονέλα εισχωρεί στον οργανισμό των ορνιθίων διαμέσου των εντερικών κυττάρων (Jin *et al.* 1997).

Η χορήγηση ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών σε ορνίθια με ηλικία μίας ημέρας οδηγεί στην αποίκηση του εντερικού βλεννογόνου σχηματίζοντας ένα στρώμα μικροχλωρίδας που καταλαμβάνει τις θέσεις προσκόλλησης, προστατεύοντας τα ορνίθια έναντι της μόλυνσης από την σαλμονέλα (Jin *et al.* 1997). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την θεωρία ότι ο ανταγωνισμός για τις θέσεις προσκόλλησης είναι ο κύριος μηχανισμός παρεμπόδισης των παθογόνων βακτηρίων από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, διότι την πρώτη μέρα ζωής των ορνιθίων η προστασία έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών δεν μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας (π.χ. βακτηριοσίνες, λιπαρά οξέα μικρής αλύσου).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο, που επιτυγχάνεται με παθητικές, υδροφοβικές και πολυμερικές δυνάμεις και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Bouzaine *et al.* 2005). *In vitro* έρευνες, δείχνουν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια διατηρούν αυτήν την ικανότητα μετά από την αδρανοποίηση τους είτε με θέρμανση (80 ή 100 °C) είτε με υπεριώδη ακτινοβολία (Ouwehand *et al.* 2000).

### **2.3.2.2 Ενίσχυση της εντερικής ακεραιότητας**

Τα προβιοτικά φαίνεται να ενισχύουν και να διατηρούν την ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνου προκαλώντας αλλαγές, στο στρώμα της βλέννης που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο (Tsirtsikos *et al.* 2012, Aliakbarpour *et al.* 2012), στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου (Chichlowski *et al.* 2007c) και στη σύνδεση μεταξύ γειτονικών κυττάρων μέσω των TJs (Rajput *et al.* 2013, Song *et al.* 2014).

Αναλυτικότερα, αύξηση στο πάχος του στρώματος της βλέννης μετά από διαιτητική χορήγηση προβιοτικού παρατηρήθηκε στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 42 ημερών (Tsirtsikos *et al.* 2012). Επίσης, η γονιδιακή έκφραση του mRNA καθώς και τα επίπεδα των βλεννινών αυξήθηκαν μετά την προσθήκη πολυστέλεχων προβιοτικών σε σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Smirnov *et al.* 2005). Σε μία άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση των καλυκοειδών κυττάρων στις εντερικές λάχνες ορνιθίων μετά την χορήγηση προβιοτικού που περιείχε *Lactobacillus*, *Bifidobacterium thermophilum* και *Enterococcus faecium* (Chichlowski *et al.* 2007c)

Αναφορικά με την επίδραση των προβιοτικών στη δομή της TJ, η προσθήκη προβιοτικού αποτελούμενο από τα είδη *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* και *Lactobacillus plantarum* οδήγησε στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της οκλουδίνης στη νήστιδα ορνιθίων 42 ημερών (Song *et al.* 2014). Επιπλέον, η ενσωμάτωση διαφόρων στελεχών του είδους *B. subtilis* στο σιτηρέσιο οδήγησε σε αυξημένη έκφραση των γονιδίων *JAM2* (Συνδετικό μόριο πρόσδεσης 2), *ZOI* και *OCN* σε σύγκριση με το μάρτυρα στον ειλέο (Gadde *et al.* 2017). Τέλος, η εισαγωγή του προβιοτικού *Bacillus amyloliquefaciens* σε συγκέντρωση  $5,4 \times 10^9$  CFU / kg τροφής ανέτρεψε τις αρνητικές επιδράσεις της διέγερσης με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) μειώνοντας την έκφραση της *CLND2* και αυξάνοντας την έκφραση της *ZOI* σε ορνίθια 20 ημερών (Li *et al.* 2015).

### 2.3.2.3 Ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης

Οι μικροοργανισμοί στο εντερικό σύστημα έρχονται σε στενή επαφή με τα εντεροκύτταρα και τους τοπικούς κλάδους του ανοσιακού συστήματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του ξενιστή και των βακτηριακών κυττάρων οδηγεί στην διαμόρφωση της ανοσιακής απάντησης (Kogut *et al.* 2005). Η προσθήκη προβιοτικών στη διατροφή των ορνιθίων ρυθμίζει την ανοσιακή απάντηση σε τοπικό και συστημικό επίπεδο. Τα προβιοτικά ρυθμίζουν την έμφυτη και επίκτητη ανοσία με τρόπο διαφορετικό ανάλογα το είδος του βακτηρίου (Rajput *et al.* 2013) και την ηλικία του ορνιθίου (Lee *et al.* 2010), μέσω της διαμόρφωσης της λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων (Drakes *et al.* 2004), των μακροφάγων (Higgins *et al.* 2007, Lee *et al.* 2011) και των T (Bai *et al.* 2013) και B λεμφοκυττάρων (Haghighi *et al.* 2006, Rajput *et al.* 2013).

Ο ακριβής μηχανισμός της ρύθμισης της ανοσιακής απάντησης δεν είναι ακόμα διευκρινισμένος. Παρόλα αυτά έρευνες δείχνουν, ότι τα προβιοτικά διεγείρουν διαφορετικά υποσύνολα του ανοσιακού συστήματος στο να παράγουν κυτταροκίνες, οι οποίες παίζουν ρόλο στην επαγωγή και στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης (Lee *et al.* 2010, Brisbin *et al.* 2010, Bai *et al.* 2013, Waititu *et al.* 2014). *In vitro* μελέτη, που διερεύνησε την επίδραση διαφορετικών ειδών του γένους *Lactobacillus* σε μονοπύρηνα κύτταρα του σπλήνα και των τυφλών εντέρων, αναφέρει ότι το είδος *L. acidophilus* διεγείρει την γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών που σχετίζονται με τα Th1 κύτταρα (IFN- $\gamma$ , IL12 και IL1 $\beta$ ) και το είδος *L. salivarius* την έκφραση του TGF- $\beta$ 4 (Brisbin *et al.* 2010). *In vivo*, η προσθήκη ενός μονοστέλεχου προβιοτικού, του είδους *Propionibacterium acidipropionici*, μείωσε την γονιδιακή έκφραση των IL6, IL10, IL13, IL4 και IL2 σε ορνίθια κρεοπαραγωγής 22 ημερών,



υποδηλώνοντας την αντιφλεγμονώδη δράση του προβιοτικού αυτού (Waititu et al. 2014). Σε μία άλλη μελέτη η ενσωμάτωση της ζύμης *Saccharomyces boulardii* και του βακτηριακού είδους *Bacillus subtilis* B10 σε συγκέντρωση  $1 \times 10^8$  cfu / kg τροφής αύξησε τη παραγωγή των κυτταροκινών IL6, TNF- $\alpha$  και TGF- $\beta$  στη νήστιδα (Rajput et al. 2013). Ακόμα, αύξηση στην γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών IL1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  και IL12 παρατηρήθηκε σε λεμφοκύτταρα του εντερικού επιθηλιακού ιστού (νήστιδα και ειλεός) ορνιθίων κρεοπαραγωγής, μετά από τη διαιτητική χορήγηση προβιοτικού *Bacillus subtilis* (Lee et al. 2014a).

### **3. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ**

Η εντερική μικροχλωρίδα είναι πλέον αναγνωρισμένη ως ένα ουσιώδες συστατικό του εντερικού οικοσυστήματος το οποίο αντιπροσωπεύει ένα δυναμικό και σύνθετο όργανο που μπορεί να αλληλεπιδρά με τον ξενιστή ποικιλοτρόπως. Η δυναμική της φύση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ωφέλιμη τροποποίηση της σύστασης της μέσω διατροφικών χειρισμών με σκοπό τη βελτίωση παραμέτρων που συμβάλλουν στην ισορροπία του εντερικού οικοσυστήματος και τη διαφύλαξη της εντερικής υγείας.

## **E. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

### **4. ΣΚΟΠΟΣ**

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη των παραγωγικών αποδόσεων και η αποτύπωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, του εντερικού επιθηλίου και της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας ως αποτέλεσμα της προσθήκης στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγών ορνιθίων ενός οξιμιστή και δύο τύπων προβιοτικού (ενεργού ή θερμικά αδρανοποιημένου). Η διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις έγινε με τη μέτρηση κρίσιμων βιοδεικτών του εντερικού οικοσυστήματος.

Σε αυτό το πλαίσιο προσδιορίστηκαν, τα παραγωγικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα η αύξηση ζώντος βάρους (AZB), η κατανάλωση τροφής (KT), ο συντελεστής εκμετάλλευσης (ΣΕ) και ο δείκτης παραγωγικής αποδοτικότητας (ΔΠΑ) για τις 3 φάσεις ανάπτυξης (Εναρξη, Ανάπτυξη, Πάχυνση) και εξετάστηκε η πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και η κατακρατηθείσα ενέργεια στο τέλος του πειράματος (37<sup>η</sup> - 42<sup>η</sup> ημέρα). Επίσης μελετήθηκε η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας στον ειλεό και στα τυφλά έντερα, καθώς και η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων κομβικής σημασίας στη διαμόρφωση της ανοσιακής αντίδρασης και στη λειτουργία του εντερικού φραγμού στον ειλεό και στα τυφλά έντερα σε ορνίθια 42 ημερών.

## **5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΖΩΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ**

Στην παρούσα διατριβή διεξήχθησαν δύο πειραματικές μελέτες, εκ των οποίων στην πρώτη έγινε προσθήκη οξινιστή (1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη), ενώ στη δεύτερη έγινε προσθήκη ενός ζωντανού ή ενός αδρανοποιημένου προβιοτικού (2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη), στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Επίσης, στις δύο πειραματικές μελέτες ενσωματώθηκε στο σιτηρέσιο ένας ΑΑΠ (Αβιλαμυκίνη) είτε μεμονωμένα (ως θετικός μάρτυρας), είτε σε συνδυασμό με τον οξινιστή, το ζωντανό ή το αδρανοποιημένο προβιοτικό. Στα υποκεφάλαια 5.2 και 5.3 που ακολουθούν περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία των πειραματικών εκτροφών για την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη αντίστοιχα. Ακολούθως, περιγράφονται οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση φυσιολογικών, ανοσιακών, και μικροβιολογικών παραμέτρων στο έντερο.

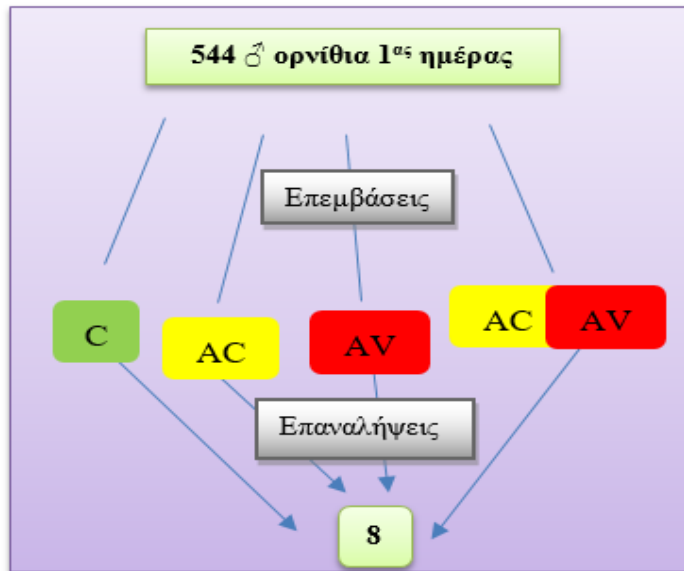
### **5.1 Χώρος διεξαγωγής των πειραμάτων**

Τα πειράματα και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα, στις πειραματικές εγκαταστάσεις και τους εργαστηριακούς χώρους του Εργαστηρίου Φυσιολογίας θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ο κυρίως χώρος εκτροφής κατασκευάστηκε σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα για στείρους χώρους ISO 14644-1 και F.S 209E. Συγκεκριμένα, είναι στεγανός, ανήκει στη κλάση 10.000 και διαθέτει 8 φίλτρα κλάσης H14 κατά EN1822 (Κλιμαθέρμικα Ε.Π.Ε, Αθήνα).

### **5.2 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη**

Για τη διεξαγωγή της πρώτης πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 544 αρσενικά ορνίθια υβρίδια κρεοπαραγωγής Cobb, ηλικίας μίας ημέρας εμβολιασμένα για τις νόσους Μάρεκ, λοιμώδη βρογχίτιδα και Newcastle. Τα ορνίθια κατανεμήθηκαν με σχεδιασμό παραγοντικού πειράματος 2×2 σε 4 επεμβάσεις, με 8 επαναλήψεις, η καθεμία από τις οποίες περιελάμβανε 17 ορνίθια (Εικόνα 5.5). Τα ορνίθια της κάθε επανάληψης τοποθετήθηκαν εντός ανεξάρτητων κλωβών εμβαδού 1m<sup>2</sup> με στρωμνή από ριζοφλοιό.



**Εικόνα 5.5.** Σχηματική απεικόνιση της κατανομής ορνιθίων στις πειραματικές επεμβάσεις της 1<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της εταιρίας Cobb - Vantress (Guide 2012) σε κάθε κλωβό τοποθετήθηκαν 3 ανεξάρτητες ταΐστρες, 3 αυτόματες ποτίστρες και μία θερμαντική λυχνία. Επίσης, ρυθμίστηκε η θερμοκρασία της πειραματικής εκτροφής στην ιδανική για κάθε φάση ανάπτυξης των ορνιθίων (Guide 2012). Η φροντίδα και η εποπτεία των πτηνών και της εγκατάστασης ήταν καθημερινή. Η διάρκεια φωτισμού κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 23 ώρες, εκτός την πρώτη μέρα στην οποία εφαρμόστηκε 24 ώρες φως.

Όλες οι πειραματικές επεμβάσεις έλαβαν σιτηρέσιο βασισμένο στα σπέρματα και το σογιάλευρο (ΒΣ) για κάθε για κάθε φάση ανάπτυξης (π.χ. εναρκτήριο 1<sup>η</sup> - 14<sup>η</sup> ημέρα, ανάπτυξης 15<sup>η</sup> - 28<sup>η</sup> ημέρα και πάχυνσης 29<sup>η</sup> - 42<sup>η</sup> ημέρα, πίνακας 5.6).

**Πίνακας 5.6.** Συστατικά (g / kg), εκτιμηθείσα χημική σύσταση (g / kg) και ενέργεια (MJ/kg τροφής) των σιτηρεσιών της 1<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης

Συστατικά	Εναρκτήριο (1 <sup>η</sup> - 14 <sup>η</sup> ημ)	Ανάπτυξης (15 <sup>η</sup> - 28 <sup>η</sup> ημ)	Πάχυνσης (29 <sup>η</sup> - 42 <sup>η</sup> ημ)
<b>Αραβόσιτος (Σπέρματα)</b>	593,08	600,11	600,00
<b>Σογιάλευρο (46%)</b>	341,50	283,70	256,80
<b>Σογιέλαιο</b>	22,80	0,00	0,00
<b>Φυτικό λίπος<sup>1</sup></b>	0,00	40,70	56,90
<b>Πίτυρα σίτου</b>	0,00	34,00	47,20
<b>Μαρμαρόσκονη</b>	13,70	13,40	12,60
<b>Φωσφορικό μονοασβέστιο</b>	16,20	15,20	13,90
<b>Αλάτι</b>	4,50	3,80	3,60
<b>Λυσίνη</b>	1,20	1,70	1,90
<b>Μεθειονίνη</b>	2,40	2,40	2,50
<b>Θρεονίνη</b>	0,02	0,39	0,60
<b>Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία<sup>2</sup></b>	4,00	4,00	4,00
<b>Κοκκιδιοστατικό<sup>4</sup></b>	0,60	0,60	0,00
<b>ΑΑΠ<sup>5</sup></b>	-	-	-
<b>Οξινιστής<sup>6</sup></b>	-	-	-
<b>Εκτιμηθείσα σύσταση (g/kg τροφής)</b>			
<b>ΑΜΕ<sub>n</sub>.( MJ/kg τροφής)<sup>7</sup></b>	12,5	12,9	13,29
<b>Ξηρά ουσία</b>	895,0	896,2	897,4
<b>Αζωτούχες ουσίες</b>	210,0	190,0	180,0
<b>Λιπαρές ουσίες</b>	50,8	69,1	85,2
<b>Ινώδεις ουσίες</b>	30,1	31,1	31,2
<b>Λυσίνη</b>	12,0	11,0	10,5
<b>Μεθειονίνη + κυστεΐνη</b>	8,9	8,4	8,2
<b>Θρεονίνη</b>	7,9	7,4	7,2
<b>Ασβέστιο</b>	10,0	9,6	9,0
<b>Διαθέσιμος φώσφορος</b>	5,0	4,8	4,5
<b>Νάτριο</b>	2,0	1,7	1,6

<sup>1</sup>Φυτικό λίπος με λεκθίνη (BERGAFAT HTL-306. Berg & Schmidt. Αμβούργο. Γερμανία)

<sup>2</sup> Το πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την φάση έναρξης και ανάπτυξης (Rovimix 11 Bro Basic, Rovimix Bro M. Roche., DSM, Ολλανδία) παρέχονταν ανά κιλό τροφής: 3,6 mg ρετινόλη (Vit.A), 100 μg χολοκαλσιφερόλη (Vit.D3), 80 mg Vit E, 9 mg Μεναδιόνη (Vit.K3), 3 mg Θειαμίνη, 7 mg Ριβοφλαβίνη, 6 mg Πυριδοξίνη, 25 mg Κυανοκοβαλαμίνη, 50 mg Νικοτινικό οξύ, 15 mg Παντοθενικό οξύ, 1,5 mg Φυλλικό οξύ, 150 μg Βιοτίνη. Το πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων για τη φάση πάχυνσης (Rovimix 12 Bro Basic, DSM, Ολλανδία) παρέχονταν ανά κιλό τροφής: 3,6 mg ρετινόλη (Vit.A), 75 μg χολοκαλσιφερόλη (Vit.D3), 50 mg Vit.E, 7 mg Μεναδιόνη (Vit.K3), 3 mg Θειαμίνη, 6 mg Ριβοφλαβίνη, 6 mg Πυριδοξίνη, 25 mg Κυανοκοβαλαμίνη, 40 mg Νικοτινικό οξύ, 12 mg Παντοθενικό οξύ, 1,2 mg Φυλλικό οξύ, 150 μg Βιοτίνη, 400 mg χλωριούχο χολίνη, 250 μg Co, 1,5 mg I, 300 μg Se, 50 mg Fe, 130 mg Mn, 20 mg Cu και 100 mg Zn.

<sup>3</sup> Το κοκκιδιοστατικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Monteban 100* (Elanco Animal Health. Greenfield.USA).

<sup>4</sup> Αντιμικροβιακός αυξητικός παράγοντας (avilamycin 10% active components: Maxus 100. Elanco Animal Health. Greenfield.USA) προστέθηκε σε συγκέντρωση 25 mg/kg τροφής εις βάρος του αραβόσιτου.

<sup>5</sup> Ο οξινιστής (Biotronic® Top 3. Biomin GmbH, Austria) προστέθηκε σε συγκέντρωση 1 g/kg τροφής εις βάρος του αραβόσιτου.

<sup>6</sup>Φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια της τροφής διορθωμένη ως προς την κατακράτηση N

Ανάλογα με τη προσθήκη στο ΒΣ οξινιστή (AC) ή / και αβιλαμυκίνης (AV), τα ορνίθια κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες 4 επεμβάσεις: C: μάρτυρας, ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: ΒΣ με προσθήκη οξινιστή 1g / kg τροφής, AV: ΒΣ με προσθήκη αβιλαμυκίνης 2,5 mg / kg τροφής και ACAV: συνδυασμός AC+AV (Πίνακας 5.7). Στην εναρκτήρια φάση καθώς και στη φάση ανάπτυξης για όλες τις πειραματικές επεμβάσεις έγινε προσθήκη κοκκιδιοστατικού. Η τροφή καθώς και το νερό ήταν κατά βούληση για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Ο οξινιστής που προστέθηκε στις επεμβάσεις AC και ACAV έχει την εμπορική ονομασία Biotronic® Top 3 (Biomim GmbH, Herzogenburg, Austria) και συνίσταται από οργανικά οξέα (μυρμηκικό, προπιονικό, και οξικό οξύ) και τα αντίστοιχα αλατά τους σε αναλογία 394 g / kg, αρωματικές ουσίες, αντισυσσωματοποιητικό παράγοντα και φορέα.

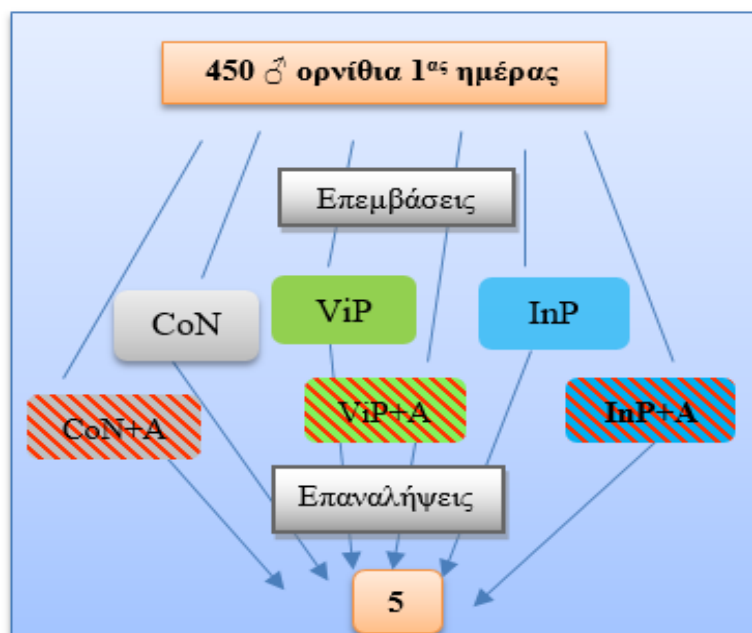
**Πίνακας 5.7.** Κατανομή επεμβάσεων με βάση την τελική σύνθεση του σιτηρεσίου της 1<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης

Επεμβάσεις Σιτηρεσίου	C	AC	AV	ACAV
	ΒΑΣΙΚΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ (Πίνακας 5.6)			
Οξινιστής (1g / kg τροφής)	-	+	-	+
Αντιμικροβιακός αυξητικός παράγοντας (2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής)	-	-	+	+

### 5.3 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη

Για τη διεξαγωγή της 2<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 450 αρσενικά ορνίθια υβρίδια κρεοπαραγωγής Cobb ηλικίας μιας ημέρας εμβολιασμένα για τις νόσους Μάρεκ, λοιμώδη βρογχίτιδα και Newcastle. Τα ορνίθια κατανεμήθηκαν με σχεδιασμό παραγοντικού πειράματος 3×2 σε 6 επεμβάσεις, με 5 επαναλήψεις και 15 ορνίθια ανά επανάληψη (Εικόνα 5.6). Τα ορνίθια της κάθε επανάληψης τοποθετήθηκαν εντός ανεξάρτητων κλωβών εμβαδού 1m<sup>2</sup> με στρωμή από ριζοφλοιό (Εικόνα 5.7).

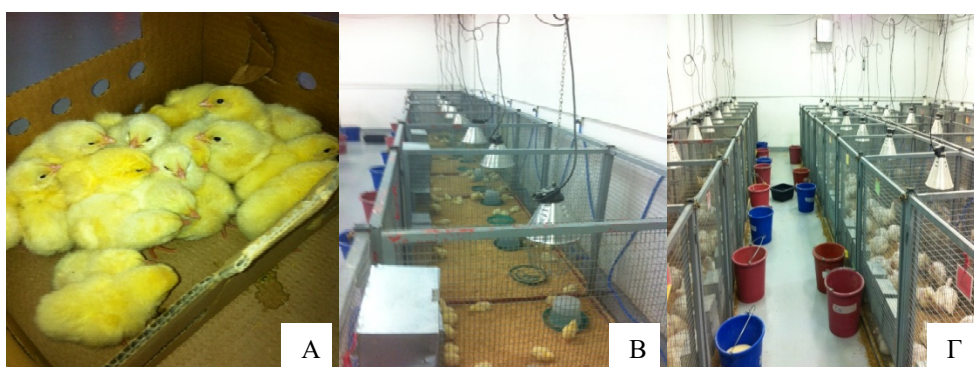
Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της εταιρίας Cobb - Vantress (Guide 2012) σε κάθε κλωβό τοποθετήθηκαν 3 ανεξάρτητες ταΐστρες, 3 αυτόματες ποτίστρες και μία θερμαντική λυχνία. Επίσης, ρυθμίστηκε η θερμοκρασία της πειραματικής εκτροφής στην ιδανική για κάθε φάση ανάπτυξης των ορνιθίων (Guide 2012).



**Εικόνα 5.6.** Σχηματική απεικόνιση της κατανομής ορνιθίων στις πειραματικές επεμβάσεις της 2<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης

Η φροντίδα και η εποπτεία των πτηνών και την εγκατάστασης ήταν καθημερινή. Η διάρκεια φωτισμού κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 23 ώρες, εκτός την πρώτη μέρα στην οποία εφαρμόστηκε 24 ώρες φως. Η διάρκεια φωτισμού κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 23 ώρες, εκτός την πρώτη μέρα στην οποία εφαρμόστηκε 24 ώρες φως.

Όλες οι πειραματικές επεμβάσεις έλαβαν ΒΣ για κάθε φάση ανάπτυξης (π.χ. εναρκτήριο 1<sup>η</sup> - 14<sup>η</sup> ημέρα, ανάπτυξης 15<sup>η</sup> - 28<sup>η</sup> ημέρα και πάχυνσης 29<sup>η</sup> - 42<sup>η</sup> ημέρα, πίνακας 5.8).



**Εικόνα 5.7.** Φωτογραφίες από διάφορες περιόδους των πειραματικών εκτροφών Α) Ορνίθια μιας ημέρας Β) Ορνίθια την 1<sup>η</sup> εβδομάδα ζωής Γ) Ορνίθια στην φάση πάχυνσης

**Πίνακας 5.8.** Συστατικά (g / kg) εκτιμηθείσα χημική σύσταση (g / kg) και ενέργεια (MJ/kg τροφής) των σιτηρεσίων της 2<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης

Συστατικά (g/kg)	Εναρκτήριο (1 <sup>η</sup> - 14 <sup>η</sup> ημ.)	Ανάπτυξης (15 <sup>η</sup> - 28 <sup>η</sup> ημ.)	Πάχυνσης (29 <sup>η</sup> - 42 <sup>η</sup> ημ)
<b>Αραβόσιτος (Σπέρματα)</b>	556,9	611,2	624,5
<b>Σογιάλευρο (44%)</b>	364,7	306,8	284,3
<b>Σογιέλαιο</b>	25,0	0,00	0,00
<b>Φυτικό λίπος<sup>1</sup></b>	11,2	40,4	52,4
<b>Μαρμαρόσκονη</b>	13,7	13,3	12,4
<b>Φωσφορικό μονοασβέστιο</b>	16,1	15,5	14,3
<b>Αλάτι</b>	4,7	3,9	3,7
<b>Λυσίνη</b>	0,95	1,5	1,6
<b>Μεθειονίνη</b>	2,2	2,3	2,3
<b>Θρεονίνη</b>	0,01	0,37	0,51
<b>Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία<sup>2</sup></b>	4,0	4,0	4,0
<b>Κοκκιδιοστατικό<sup>3</sup></b>	0,60	0,60	0,00
<b>ΑΑΠ<sup>4</sup></b>	-	-	-
<b>Τύπος προβιοτικού<sup>5</sup></b>	-	-	-
<b>Εκτιμηθείσα σύσταση (g/kg τροφής)</b>			
<b>ΑΜΕ<sub>n</sub>,( MJ/kg τροφής)<sup>6</sup></b>	12,5	12,9	13,29
<b>Ξηρά ουσία</b>	898,0	898,3	899,2
<b>Αζωτούχες ουσίες</b>	210,0	190,0	181,4
<b>Λιπαρές ουσίες</b>	59,8	65,7	77,8
<b>Ινώδεις ουσίες</b>	37,8	34,9	33,6
<b>Λυσίνη</b>	12,0	11,0	10,5
<b>Μεθειονίνη + κυστεΐνη</b>	8,9	8,4	8,2
<b>Θρεονίνη</b>	7,9	7,4	7,2
<b>Ασβέστιο</b>	10,0	9,6	9,0
<b>Διαθέσιμος φώσφορος</b>	5,0	4,8	4,5
<b>Αλάτι</b>	2,0	1,7	1,6

<sup>1</sup> Φυτικό λίπος με λεκιθίνη (BERGAFAT HTL-306, Berg & Schmidt, Αμβούργο, Γερμανία).

<sup>2</sup> Το πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την φάση έναρξης και ανάπτυξης (Rovimix 11 Bro Basic, Rovimix Bro M. Roche., DSM, Ολλανδία) παρέχονταν ανά κίλο τροφής: 3,6 mg ρετινόλη (Βιτ.Α), 100 μg χολοκαλσιφερόλη (Βιτ.Δ3), 80 mg Βιτ Ε, 9 mg Μεναδιόνη (Vit.Κ3), 3 mg Θειαμίνη, 7 mg Ριβοφλαβίνη, 6 mg Πυριδοξίνη, 25 mg Κυανοκοβαλαμίνη, 50 mg Νικοτινικό οξύ, 15 mg Παντοθενικό οξύ, 1,5 mg Φυλλικό οξύ, 150 μg Βιοτίνη. Το πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων για τη φάση πάχυνσης (Rovimix 12 Bro Basic, DSM, Ολλανδία) παρέχονταν ανά κίλο τροφής: 3,6 mg ρετινόλη (Vit.Α), 75 μg χολοκαλσιφερόλη (Vit.Δ3), 50 mg Βιτ.Ε, 7 mg Μεναδιόνη (Vit.Κ3), 3 mg Θειαμίνη, 6 mg Ριβοφλαβίνη, 6 mg Πυριδοξίνη, 25 mg Κυανοκοβαλαμίνη, 40 mg Νικοτινικό οξύ, 12 mg Παντοθενικό οξύ, 1,2 mg Φυλλικό οξύ, 150 μg Βιοτίνη, 400 mg χλωριούχο χολίνη, 250 μg Co, 1,5 mg I, 300 μg Se, 50 mg Fe, 130 mg Mn, 20 mg Cu και 100 mg Zn.

<sup>3</sup> Το κοκκιδιοστατικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Monteban 100* (Elanco Animal Health, Ηνωμένες Πολιτείες).

<sup>4</sup> Ο αντιμικροβιακός αυξητικός παράγοντας (αβιλαμυκίνη 10% ενεργό συστατικό: Maxus 100, Elanco Animal Health, Ηνωμένες Πολιτείες) προστέθηκε στα αντίστοιχα σιτηρέσια (CoN+A; ViP+A and InP+A) σε συγκέντρωση 25 mg/kg τροφής σε βάρος του αραβοσίτου.

<sup>5</sup> Ο τύπος του προβιοτικού (Ενεργό ή αδρανοποιημένο) προστέθηκε στα ανάλογα σιτηρέσια (ViP, ViP+A and InP, InP+A) σε συγκέντρωση 1 g/kg εις βάρος του αραβοσίτου.

<sup>6</sup> Φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια της τροφής διορθωμένη ως προς την κατακράτηση N



Ανάλογα με τον τύπο προσθήκης του προβιοτικού στο ΒΣ (Χωρίς: χωρίς προσθήκη προβιοτικού, Ενεργό: προβιοτικό σε συγκέντρωση  $10^8$  CFU / kg τροφής, Αδρανοποιημένο: Θερμικά αδρανοποιημένο προβιοτικό) και ανάλογα με το εάν έγινε ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης (2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής) ή όχι, τα ορνίθια κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες 6 επεμβάσεις: CoN: μάρτυρας, ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, CoN+A: ΒΣ + 2,5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής, ViP: ΒΣ με προσθήκη ενεργού προβιοτικού 1g / kg τροφής, ViP+A: ΒΣ με προσθήκη ενεργού προβιοτικού 1g / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής, InP: ΒΣ με προσθήκη αδρανοποιημένου προβιοτικού 1g / kg τροφής, InP+A: ΒΣ με προσθήκη αδρανοποιημένου προβιοτικού 1g / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής (Πίνακας 5.9). Στην εναρκτήρια φάση και στην φάση ανάπτυξης σε όλες τις πειραματικές επεμβάσεις έγινε προσθήκη κοκκιδιοστατικού. Η τροφή καθώς και το νερό ήταν κατά βούληση για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Το προβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε (PoultryStar®, BIOMIN GmbH, Austria) στη παρούσα διατριβή απαρτιζόταν από 5 βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από τον πρόλοβο (*Lactobacillus reuteri* DSM 16350), τη νήστιδα (*Enterococcus faecium* DSM 16211), τον ειλεό (*Bifidobacterium animalis* DSM 16284) και το τυφλό έντερο (*Pediococcus acidilactici* DSM 16210 και *Lactobacillus salivarius* DSM 16351) υγείων ενήλικων ορνιθίων, το οποίο περιείχε ως φορέα τον πολυσακχαρίτη ινουλίνη. Η αδρανοποιημένη μορφή του παράχθηκε μετά από θέρμανση στους 123 °C για 20 min. Η θερμική αδρανοποίηση του επιβεβαιώθηκε μέσω τριπλής μηδενικής μέτρησης μετά από καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Wilkins-Chalgren (Oxoid, Basingstoke, UK). Κάθε μορφή του προβιοτικού προστέθηκε σε συγκέντρωση 1 g / kg τροφής.

**Πίνακας 5.9.** Κατανομή επεμβάσεων με βάση τη τελική σύνθεση του σιτηρεσίου της 2<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης

<i>Επεμβάσεις Σιτηρεσίου</i>	<b>CoN</b>	<b>ViP</b>	<b>InP</b>	<b>CoN+A</b>	<b>ViP+A</b>	<b>InP+A</b>
	<b>ΒΑΣΙΚΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ (Πίνακας 5.8)</b>					
<i>Ενεργό προβιοτικό (1g / kg τροφής)</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Αδρανοποιημένο προβιοτικό (1g / kg τροφής)</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Αντιμικροβιακός αυξητικός παράγοντας (2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής)</i>	-	-	-	+	+	-

Τα πειραματικά πρωτόκολλα της 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> μελέτης ήταν σε συμφωνία με την ισχύουσα οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς (EC 43/2007; EU 63/2010) και εγκρίθηκαν από την αρμόδια εθνική αρχή και από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Με το τέλος των πειραματικών εκτροφών της 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης και μετά τη διενέργεια των απαραίτητων δειγματοληψιών το πλήθος των ορνιθίων αποτεφρώθηκε κατόπιν ευθανασίας.

#### **5.4 Παράμετροι που προσδιορίστηκαν**

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής προσδιορίστηκαν τα εξής:

1. τα παραγωγικά χαρακτηριστικά,
2. η πεπτικότητα θρεπτικών ουσιών και το ποσοστό της κατακρατηθείσας ενέργειας,
3. η έκφραση επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα σε δευτερογενή λεμφικά όργανα
4. η σύσταση της μικροχλωρίδας στον ειλεό και στα τυφλά έντερα
5. η έκφραση επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό

##### **5.4.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά**

Σε εβδομαδιαία βάση προσδιορίστηκαν το ζών βάρος των ορνιθίων, η AZB, η KT και ο ΣΕ (ΣΕ; KT : AZB) τα οποία παρουσιάζονται ανά φάση ανάπτυξης αλλά και για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η θνησιμότητα των ορνιθίων καταγράφονταν σε ημερησία βάση και η βιωσιμότητα των ορνιθίων υπολογίστηκε και παρουσιάζεται για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης υπολογίστηκε ο ΔΠΑ για όλη τη διάρκεια του πειράματος σύμφωνα με τον εξής τύπο :  $(\Delta\text{ΠΑ} = [\text{βιωσιμότητα (\%)} \times \text{ζών βάρος (kg)} / \text{ηλικία (ημ)} \times \text{ΣΕ}] \times 100)$  σύμφωνα με τους Awad *et al.* (2008).

#### 5.4.2 Ολική και ειλεακή πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας

Για την 1<sup>η</sup> και την 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη η εκτίμηση της πεπτικότητας θρεπτικών συστατικών άρχισε την 35<sup>η</sup> ημέρα ζωής των ορνιθίων. Στην 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη επιλέχθηκαν τυχαία 16 ορνίθια ανά επέμβαση (2 ορνίθια ανά επανάληψη) και ακολούθως χωρίστηκαν σε ομάδες των τεσσάρων ορνιθίων και τοποθετήθηκαν σε 4 κλωβοστοιχίες (κάθε επέμβαση είχε τέσσερις επαναλήψεις-κλουβιά των τεσσάρων ορνιθίων το καθένα). Στη 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη επιλέχθηκαν τυχαία 20 ορνίθια ανά επέμβαση (4 ορνίθια ανά επανάληψη) και ακολούθως χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε ορνιθίων και τοποθετήθηκαν σε 4 κλωβοστοιχίες (κάθε επέμβαση είχε τέσσερις επαναλήψεις-κλουβιά των πέντε ορνιθίων το καθένα). Καθεμία από τις κλωβοστοιχίες είχε βάση από συρματόπλεγμα και δίσκο συλλογής περιττωμάτων. Η πειραματική διαδικασία διήρκησε 7 ημέρες από τις οποίες οι 4 πρώτες αποτέλεσαν τη προπειραματική περίοδο προσαρμογής. Κατά τη διάρκεια των τριών ημερών συλλογής, τα περιττώματα από κάθε κλουβί συλλέγονταν ανά 8 ώρες και αποθηκεύονταν σε σακούλες αποθήκευσης μίας χρήσης, σφραγίζονταν και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους. Σε περίπτωση που στους δίσκους συλλογής υπήρχε πτέρωμα από τα ορνίθια, αυτό απομακρύνονταν. Για το προσδιορισμό της ολικής φαινομένης πεπτικότητας (ΟΦΠ) των θρεπτικών συστατικών όλα τα περιττώματα που συλλέχτηκαν ανά κλουβί ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ως μία επανάληψη. Το υπόλειμμα τροφής σε κάθε κλουβί απομακρύνθηκε προσεκτικά και ζυγίστηκε.

Για το προσδιορισμό της ειλεακής πεπτικότητας της τροφής, στο τέλος της τρίτης ημέρας συλλογής όλα τα ορνίθια θανατώθηκαν και αμέσως αφαιρέθηκε ο ειλεός. Ακολούθως, το ειλεακό περιεχόμενο εκκενώθηκε με ήπιο τρόπο και τοποθετήθηκε σε σακούλες αποθήκευσης στους -20 °C. Το ειλεακό περιεχόμενο από κάθε κλουβί ομαδοποιήθηκε και αναλύθηκε ως μία επανάληψη (κάθε επέμβαση είχε 4 επαναλήψεις).

Η διαδικασία ανάλυσης της τροφής, του ειλεακού περιεχομένου και των περιττωμάτων των ορνιθίων για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, του ουρικού οξέος και της ενέργειας έγινε σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Mountzouris *et al.* 2010).

Εν συντομία, στην τροφή και στα περιττώματα προσδιορίστηκε η ξηρά ουσία (ΞΟ), η οργανική ουσία (ΟΟ), η τέφρα, οι λιπαρές ουσίες (ΛΟ), οι αζωτούχες ουσίες (ΑΟ), οι οποίες καθορίζονται ως 6,25 × ποσότητα αζώτου που ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο Kjeldahl και οι ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες (ΕΝΕΟ).

### 5.4.3 Δειγματοληψία ιστών

Στις 42 μέρες διάρκειας των πειραμάτων 8 ορνίθια ανά επέμβαση (ένα ορνίθιο / επανάληψη) για την 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη και 10 ορνίθια ανά επέμβαση για την 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη (δύο ορνίθια / επανάληψη) επιλέχθηκαν τυχαία και θυσιάστηκαν. Κάτω από άσηπτες συνθήκες τα σφάγια, ανοίχθηκαν και συλλέχθηκαν, ο ειλεός, ο σπλήνας, τα τυφλά έντερα και οι δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων. Όλοι οι ιστοί εμβαπτίστηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω ανάλυση τους.

### 5.4.4 Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα των ορνιθίων

#### 5.4.4.1 Απομόνωση RNA από το σπλήνα και τους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου

Η απομόνωση του ολικού RNA από τον σπλήνα και τους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου διεξήχθη χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trifast (PEQLAB Biotechnologie GmbH) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσοτική εκτίμηση του ολικού RNA έγινε με ειδικό φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 5.8, Q5000 UV, Quawell, San Jose, CA 95161 USA) και μέτρηση σε μήκος κύματος 260. Το προϊόν RNA υποβλήθηκε σε επεξεργασία με το ένζυμο DNase για τη λύση τυχόν υπολείμματος γενωμικού DNA. Περιληπτικά, σε 10 μg ολικού RNA προστεθήκαν 1 U ένζυμο



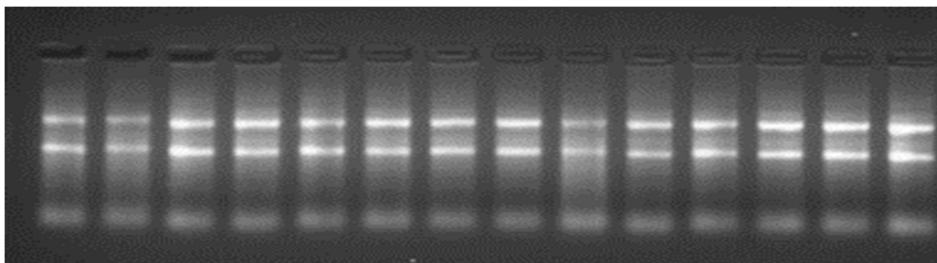
**Εικόνα 5.8.** Φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων Quawell

DNase I (M0303, New England Biolabs Inc, Ipswich, UK) και 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10× και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Η απενεργοποίηση του ενζύμου DNase I έγινε με τη προσθήκη 1 μl 0,5 M EDTA και εν συνεχεία επώαση στους 75 °C για 10 λεπτά.

#### 5.4.4.2 Ακεραιότητα του ολικού RNA

Η εκτίμηση της ποσότητας και της ποιότητας του του ολικού RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα που αναλύθηκαν προσδιορίστηκε αρχικά με φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων

(Q5000 UV, Quawell, San Jose, CA 95161 USA) εκτιμώντας τις αναλογίες απορρόφησης στα 260 : 230 nm και 260 : 280 nm και ακολούθως με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % (Εικόνα 5.9).



**Εικόνα 5.9** Απεικόνιση ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2 %

#### **5.4.4.3 Αντίστροφη μεταγραφή (cDNA)**

Τρεις ποσότητες ολικού RNA (500ng) μεταγράφηκαν σε cDNAs με το πακέτο αντιδραστηρίων PrimeScript First Strand cDNA Synthesis (Takara), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή χρησιμοποιώντας ένα μίγμα τυχαίων εξαμερών και oligo-dT εκκινητών. Τα cDNAs αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

#### **5.4.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)**

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, διερευνήθηκε η γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IFN-γ*, της *IL12p40*, της *IL2*, της *IL22*, της *IL18*, της *IL10* και της *iNOS*.

#### **Σχεδιασμός εκκινητών**

Για αυτό το σκοπό σχεδιάστηκαν οι εκκινητές των παραπάνω γονιδίων καθώς και της αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης ως γονιδίου αναφοράς με το πρόγραμμα PerPrimer v.1.1.19 (Marshall 2004) χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφορίας των Ηνωμένων Πολιτειών (NCBI). Οι ακολουθίες των εκκινητών παρουσιάζονται στο Πίνακα 5.10. Οι εκκινητές, επιλέχθηκαν ώστε να υβριδίζουν μέσα στην κωδικεύουσα περιοχή των μεταγράφων. Επιπλέον ο ένας από τους δύο εκκινητές επιλέχθηκε να υβριδίζει σε σημεία

συνάντησης ιντρονίων/εξονίων για την αποφυγή υβριδισμού σε γενωμικό DNA. Τέλος, με βάση και τα παραπάνω κριτήρια, επιλέχθηκαν οι εκκινητές που εμφάνιζαν τη μικρότερη αμοιβαία, αλλά και εσωτερική συμπληρωματικότητα μεταξύ τους ώστε να αποφεύγεται ο υβριδισμός μεταξύ και εντός των εκκινητών.

**Πίνακας 5.10.** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για την διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα των ορνιθίων

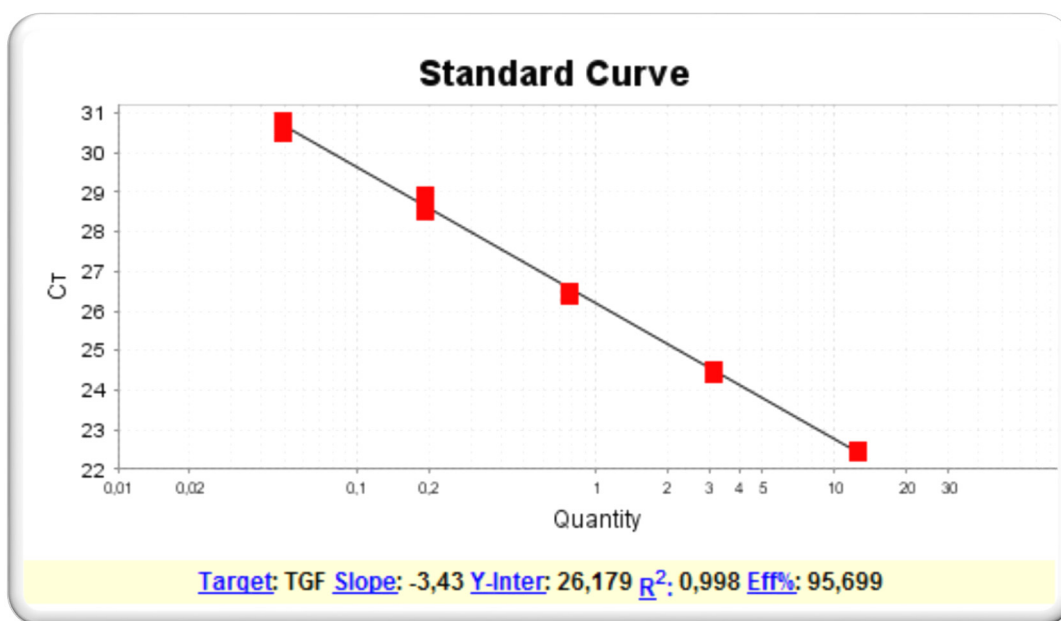
<i>Γονίδιο στόχος</i> <sup>1</sup>	<i>Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')</i> <sup>2</sup>	<i>Θερμοκρασία πρόσδεσης</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος (bp)</i>	<i>Αλληλουχία αναφοράς (NCBI)</i>
<i>GAPDH</i>	F: GCTGAATGGGAAGCTTACTG R: AAGGTGGAGGAATGGCTG	60 °C	216	NM_204305.1
<i>IFN-γ</i>	F: AGCTCCCGATGAACGAC R: CAGGAGGTCATAAGATGCCA	62 °C	151	NM_205149.1
<i>TGF-β4</i>	F: GGACGGATGAGAAGAAGCTG R: ACGGACCACCATATTGGA	62 °C	296	M31160.1
<i>IL22</i>	F: GAGCAGATGTAAATACTCAGGA R: GCTTTGTTCTTCCCATTCTC	60 °C	102	NM_001199614.1
<i>IL12p40</i>	F: TCAGAGATATCATAAAGCCAGACC R: CCAGGATGAGTTGTAATAGCGA	62 °C	256	DQ202328.1
<i>IL18</i>	F: GTTGTTCGATTTAGGGAAGGAG R: TCAAAGGCCAAGAACATTCC	60 °C	146	NM_204608.1
<i>IL10</i>	F: GACCAGCACCAGTCATCAG R: CCGTTCTCATCCATCTTCTCG	62 °C	159	EF554720.1
<i>IL2</i>	F: AGTCTTACGGGTCTAAATCACAC R: GGACAGCAGATTAGTTAGCCA	62 °C	219	AF000631.1
<i>iNOS</i>	F: AAAGAAAGGGATCAAAGGTGGT R: CAAGCATCCTCTTCAAAGTCTG	60 °C	296	NM_204961.1

<sup>1</sup>*GAPDH*: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, *TGF-β4*: μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας, *IFN-γ*: ιντερφερόνη-γ, *IL12p40*: ιντερλευκίνη-12p40, *IL2*: ιντερλευκίνη-2, *IL22*: ιντερλευκίνη-22, *IL18*: ιντερλευκίνη-18, *IL10*: ιντερλευκίνη-10, *iNOS*: επαγωγίμη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου

<sup>2</sup>F: Πρόσθιος εκκινητής, R: Οπίσθιος εκκινητής.

## Καμπύλες αναφοράς

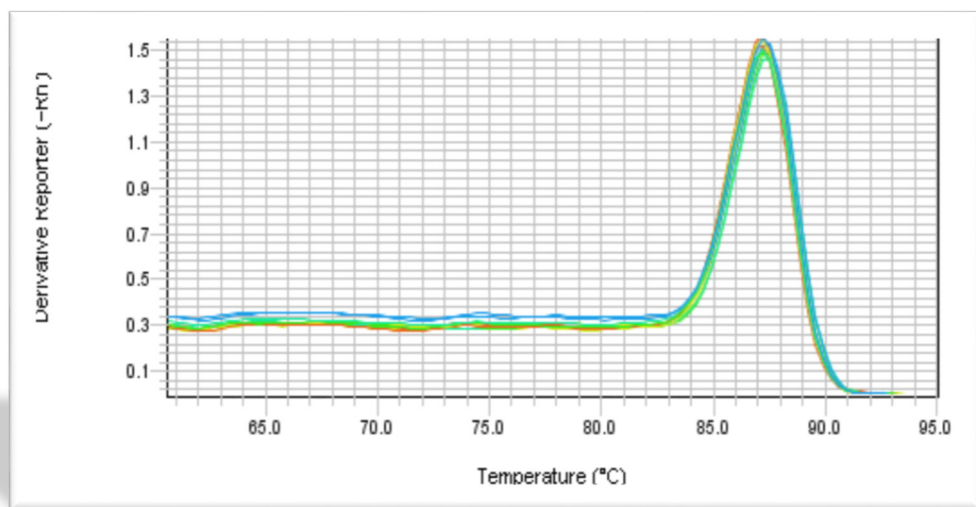
Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις (1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024) που προήλθαν από μίγμα όλων των δειγμάτων cDNA. Για κάθε ζεύγος εκκινητών διεξήχθη qPCR με τις παραπάνω σειριακές αραιώσεις, έτσι ώστε να οριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση και η κατάλληλη θερμοκρασία επαναδιάταξης/επιμήκυνσης της αντίδρασης. Η αξιολόγηση της καταλληλότητας των ανωτέρω συνθηκών της αντίδρασης αξιολογήθηκε μέσω της αποδοτικότητας της. Η αποδοτικότητα κάθε αντίδρασης θεωρήθηκε ως αποδεκτή όταν η καμπύλη αναφοράς ήταν γραμμική, υπήρχε συνοχή μεταξύ των επαναλήψεων και η ενίσχυση ήταν υψηλής απόδοσης (Efficiency 90-110 %). Επιπλέον, απαραίτητη προϋπόθεση για την αποδοχή των συνθηκών συγκέντρωσης εκκινητών και θερμοκρασίας επαναδιάταξης/επιμήκυνσης για κάθε αντίδραση αποτέλεσε η παραγωγή ενός μοναδιαίου προϊόντος PCR αναμενόμενου μεγέθους με βάση το σχεδιασμό των εκκινητών, όπως αυτό αξιολογείτο μέσω της καμπύλης τήξης της αντίδρασης. Στις εικόνες 5.10 και 5.11 παρουσιάζεται ενδεικτικά η καμπύλη αναφοράς και η καμπύλη τήξης αντίστοιχα, για το γονίδιο *TGF-β4*.



**Εικόνα 5.10** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα (*TGF-β4*)



Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε με τον θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems) με τα ενδεδειγμένα από τον κατασκευαστή αντιδραστήρια (KAPA SYBR® FAST qPCR, KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA). Κάθε αντίδραση (10  $\mu$ l) περιείχε από 200-250 nM εκκινητών. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 3min (ενεργοποίηση του ενζύμου) ακολουθούμενη από 40 κύκλους από 5 sec στους 95°C (βήμα αποδιάταξης) και 20 sec στους 60°C ή στους 62°C (βήμα προσαρμογής εκκινητών) και 33 sec στους 72°C (βήμα επιμήκυνσης). Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση καμπύλης τήξης (melt curve analysis) για να εκτιμηθεί η ειδικότητα της αντίδρασης. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε εις διπλούν.



**Εικόνα 5.11.** Καμπύλη τήξης για το γονίδιο του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα (*TGF- $\beta$ 4*)

#### 5.4.5 Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού

Για την διερεύνηση της επίδρασης των πειραματικών επεμβάσεων στη λειτουργία του εντερικού φραγμού προσδιορίστηκε η έκφραση των *ZO1*, *ZO2*, *OCN*, *CLDN1*, *CLDN5*, *TLR2B*, *TLR4* και *NFKB1* από τμήμα του ειλεού και από το ένα εκ των δύο τυφλών εντέρων.

#### 5.4.5.1 Επεξεργασία δειγμάτων

Κάθε τμήμα ιστού του ειλεού και του τυφλού εντέρου αποψύχθηκε επάνω σε πάγο και διαιρέθηκε κατά μήκος με αποστειρωμένο χειρουργικό μαχαιρίδιο. Ακολούθησε απομάκρυνση του εντερικού περιεχομένου (ειλεού ή τυφλού) έτσι ώστε να μην επηρεαστεί η υποκείμενη στιβάδα βλέννας και έκπλυση του ιστού με διάλυμα 0,1 M EDTA (pH 7,2). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε επίχρισμα ξέσματος του ειλεακού και τυφλικού βλεννογόνου (100 mg) το οποίο μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο τύπου erpendorf. Ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης RNA και μεταγραφής του (cDNA) όπως αυτές περιγράφονται στα υποκεφάλαια 5.4.5.2 και 5.4.5.3 αντίστοιχα.

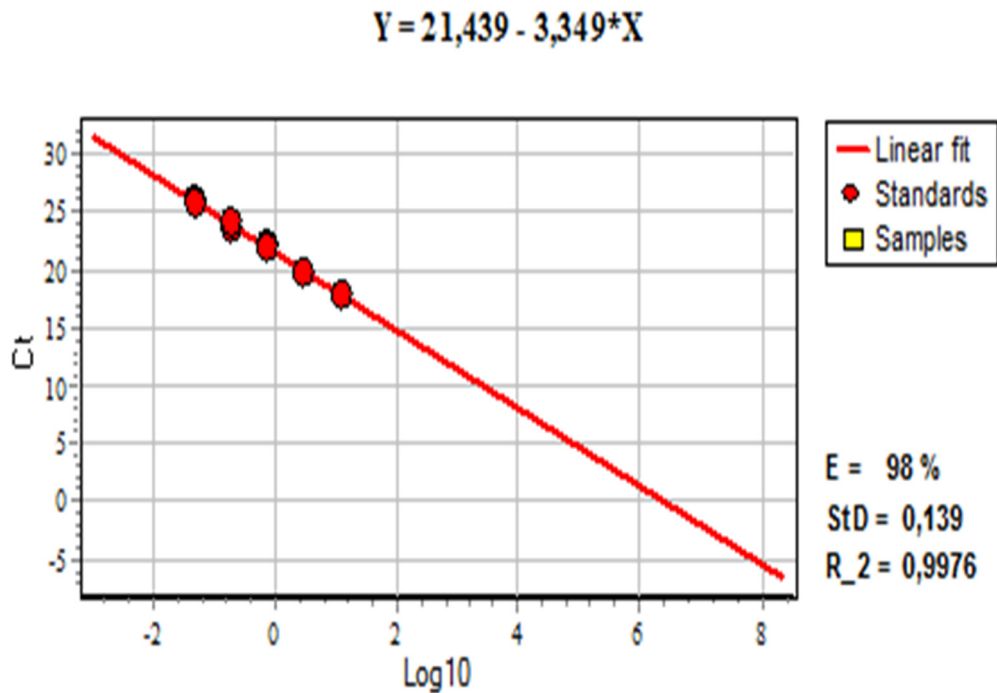
#### 5.4.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)

##### Σχεδιασμός εκκινητών

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των *ZO1*, *ZO2*, *OCN*, *CLDN1*, *CLDN5*, *TLR2B*, *TLR4*, και *NFKB1* στα κύτταρα του βλεννογόνου του ειλεού και του τυφλού εντέρου χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες εκκινητών είτε από την επιστημονική βιβλιογραφία (για τα γονίδια *OCN*, *CLDN1* και *CLDN5*) είτε σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PerlPrimer v.1.1.19 (*ZO1*, *ZO2*; Marshall 2004) χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφορίας των Ηνωμένων Πολιτειών (NCBI). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον πίνακα 5.11. Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια που περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 5.4.4.4.

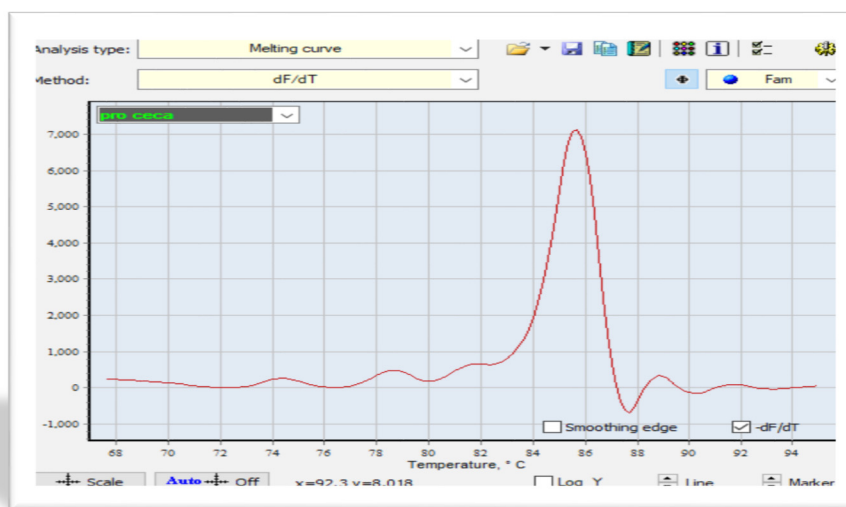
##### Καμπύλες αναφοράς

Ο καθορισμός των καμπύλων αναφοράς έγινε όπως αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 5.4.4.4. Στις εικόνες 5.12 και 5.13. παρουσιάζονται ενδεικτικά η καμπύλη αναφοράς και η καμπύλη τήξης αντίστοιχα για το γονίδιο *OCN*.



**Εικόνα 5.12.** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο της οκλουδίνης (*OCLN*)

Ο προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης των *ZO1*, *ZO2*, *OCLN*, *CLDN1*, *CLDN5*, *TLR4*, *TLR2B* και *NFKB1* στα κύτταρα του βλεννογόνου του ειλεού και του τυφλού εντέρου πραγματοποιήθηκε με το μηχάνημα SaCycler-96 (Sacace Biotechnologies) χρησιμοποιώντας το πακέτο αντιδραστηρίων KAPA SYBR® FAST qPCR (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.



**Εικόνα 5.13.** Καμπύλη τήξης για το γονίδιο της οκλουδίνης (*OCLN*)

Κάθε αντίδραση (15  $\mu$ l) περιείχε από 200-450 nM εκκινητών. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 95°C για 3 min (ενεργοποίηση του ενζύμου) ακολουθούμενη από 40 κύκλους από 5 sec στους 95°C (βήμα αποδιάταξης) και 20 sec στους 60°C ή στους 62°C (βήμα προσαρμογής εκκινητών) και 33 sec στους 72°C (βήμα επιμήκυνσης). Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση καμπύλης τήξης (melt curve analysis) για να προσδιοριστεί η εξειδίκευση της αντίδρασης. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν.

**Πίνακας 5.11.** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού.

Γονίδιο στόχος <sup>1</sup>	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3') <sup>2</sup>	Θερμοκρασία πρόσδεσης	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Αλληλουχία αναφοράς (NCBI)
<i>GAPDH</i>	F: GCTGAATGGGAAGCTTACTG R: AAGGTGGAGGAATGGCTG	60°C	216	NM_204305.1
<i>ZO1</i>	F:TAAAGCCATTCCCTGTAAGCC R:GTTTCACCTTTCTCTTTGTCC	60 °C	243	XM_015278975.1
<i>ZO2</i>	F:GTTTCACCTTTCTCTTTGTCC R:TAAAGCCATTCCCTGTAAGCC	60 °C	239	NM_204918.1
<i>OCN</i>	F:TCATCGCCTCCATCGTCTAC R:TCTTACTGCGCGTCTTCTGG	62 °C	240	NM_205128.1
<i>CLDN5</i>	F:CATCACTTCTCCTTCGTCAGC R:GCACAAAGATCTCCCAGGTC	59 °C	111	NM_204201.1
<i>CLDN1</i>	F:CTGATTGCTTCCAACCAG R:CAGGTCAAACAGAGGTACAAG	59 °C	140	NM_001013611.2
<i>TLR2B</i>	F:CTTGGAGATCAGAGTTTGGGA R:ATTTGGGAATTTGAGTGCTG	62°C	238	NM_001161650.1
<i>TLR4</i>	F: GTCTCTCCTTCCCTTACCTGCTGTTC R:AGGAGGAGAAAGACAGGGTAGGTG	65°C	187	NM_001030693.1
<i>NFKB1</i>	F: TGTGGTTGTCAGGATGGTC R: GGTCTGGTAAAGGTCATTTCTC	62°C	273	NM_205134

<sup>1</sup> *GAPDH*: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, *ZO1*: zonula occluden πρωτεΐνη 1, *ZO2*: zonula occluden πρωτεΐνη 2, *CLDN1*: κλαουδίνη 1, *CLDN5*: κλαουδίνη 5, *OCN*: οκλουδίνη, *NFKB1*: Υπομονάδα 1 του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β, *TLR2B*: toll – like υποδοχέας 2, *TLR4*: toll – like υποδοχέας 4.

<sup>2</sup> F: Πρόσθιος εκκινητής, R: Οπίσθιος εκκινητής

#### **5.4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο και στο τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών**

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής ποσοτικοποιήθηκαν επιλεγμένοι βακτηριακοί πληθυσμοί της ειλεακής και τυφλικής μικροχλωρίδας.

##### **5.4.6.1 Επεξεργασία δειγμάτων**

Για τον προσδιορισμό των βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο του ειλεού και τους σχετιζόμενους με το βλεννογόνο βακτηριακούς πληθυσμούς χρησιμοποιήθηκε τεμάχιο ειλεού μήκους 15 cm και ενός εκ των δύο τυφλών εντέρων.

Το τμήμα του ειλεού και το τυφλό έντερο αποψύχθηκαν πάνω σε πάγο και ανοίχτηκαν με διαμήκη τομή. Αρχικά συλλέχθηκε προσεκτικά το περιεχόμενο του εντερικού αυλού (ειλεού ή τυφλού) και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο φιαλίδιο για περαιτέρω ανάλυση (υποκεφάλαιο 5.4.6.2). Ύστερα συλλέχθηκε ο εναπομένον ιστός ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο. Η επεξεργασία των δειγμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων που σχετίζονται με το βλεννογόνο ήταν συνοπτικά η ακόλουθη: το τεμάχιο εντέρου πλύθηκε τρεις φορές σε διάλυμα NaCl 0.9 % (w:v) με ήπια ανάδευση για να απομακρυνθούν βακτήρια μη προσαρτημένα στον επιθηλιακό ιστό. Ακολούθως, ο ιστός υποβλήθηκε σε έντονη ανάδευση 1 min μέσα σε φιαλίδιο με 15ml φυσιολογικό ορό και 0,1 % (w/w) Tween 80. Τα εκπλύματα συνενώθηκαν και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν σε  $10.000 \times g$  για 30 min στους  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  έτσι ώστε να καθιζάνουν όλα τα κύτταρα και να δημιουργηθεί ένα συσσωμάτωμα Li *et al.* (2003).

##### **5.4.6.2 Απομόνωση βακτηριακού DNA από δείγματα ειλεού και τυφλού εντέρου**

Το περιεχόμενο του ειλεού και του τυφλού εντέρου καθώς και το σύνολο των βακτηριακών κυττάρων που σχετίζονται με το βλεννογόνο χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση βακτηριακού DNA χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο πακέτο αντιδραστηρίων (PSP® Spin Stool DNA Kit, Stratec Molecular GmbH, Berlin Germany) το οποίο τροποποιήθηκε ελαφρώς. Η τροποποίηση έγινε αναφορικά με το στάδιο λύσης, το οποίο παρατάθηκε κατά 30 λεπτά, με σκοπό την αύξηση της ανάκτησης DNA με το ένζυμο λυσοζύμη και την προσθήκη ενός

σταδίου επώασης με ένζυμο RNase διάρκειας 15 λεπτών. Κάθε απομονωμένο δείγμα DNA διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης και αποθηκεύτηκε στους -30 °C.

#### **5.4.6.3 Ποσοτικοποίηση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλεό και στο τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου**

Για την ποσοτικοποίηση του ολικού πληθυσμού των εντερικών βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* και *Bacteroides spp.*, στις βακτηριακές ομάδες *Clostridium perfringens* subgroup (*Clostridial Cluster I*), *Clostridium coccooides* subgroup (*Clostridium cluster XIVa*) και *Clostridium leptum* subgroup (*Clostridium cluster IV*) και στο είδος *Escherichia coli*, επιλέχθηκαν κατάλληλοι εκκινητές οι οποίοι είχαν ως στόχο υβριδισμού μία περιοχή του 16S rRNA γονιδίου. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από επιστημονική βιβλιογραφία (Πίνακας 5.12). Η ειδικότητα των εκκινητών επιβεβαιώθηκε μέσω *in silico* ανάλυσης χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων του (NCBI) και το λογισμικό PROBE MATCH (Ribosomal Database Project II; Cole *et al.* 2014).

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε με το μηχάνημα Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems. Foster City. CA). Οι αντιδράσεις είχαν ως τελικό όγκο τα 15 μl και απαρτίζονταν από: 7,5 μl of 2×Green Dye master mix (Rovalab GmbH. Teltow. Germany), 300 έως 450 nM πρόσθιο και οπίσθιο εκκινητή, 0,75 μl αλβουμίνη βόειου ορού (20 μg/ml), 0,15 μl, παθητική χρωστική αναφοράς ROX (50 nM τελική συγκέντρωση) και 2 μl αραιωμένο βακτηριακό DNA (20 ng δείγμα DNA/ αντίδραση). Τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 10 min (ενεργοποίηση του ενζύμου) στη συνέχεια ακολούθησαν 40 κύκλοι που περιελάμβαναν 5 sec στους 95°C (βήμα αποδιάταξης) 20 sec σε κατάλληλη θερμοκρασία πρόσδεσης (βήμα προσαρμογής εκκινητών) και 33 sec στους 72°C (βήμα επιμήκυνσης).

Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση καμπύλης τήξης για να προσδιοριστεί η εξειδίκευση της αντίδρασης. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν. Σε κάθε αντίδραση υπήρχε πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το σκοπό της ποσοτικοποίησης.

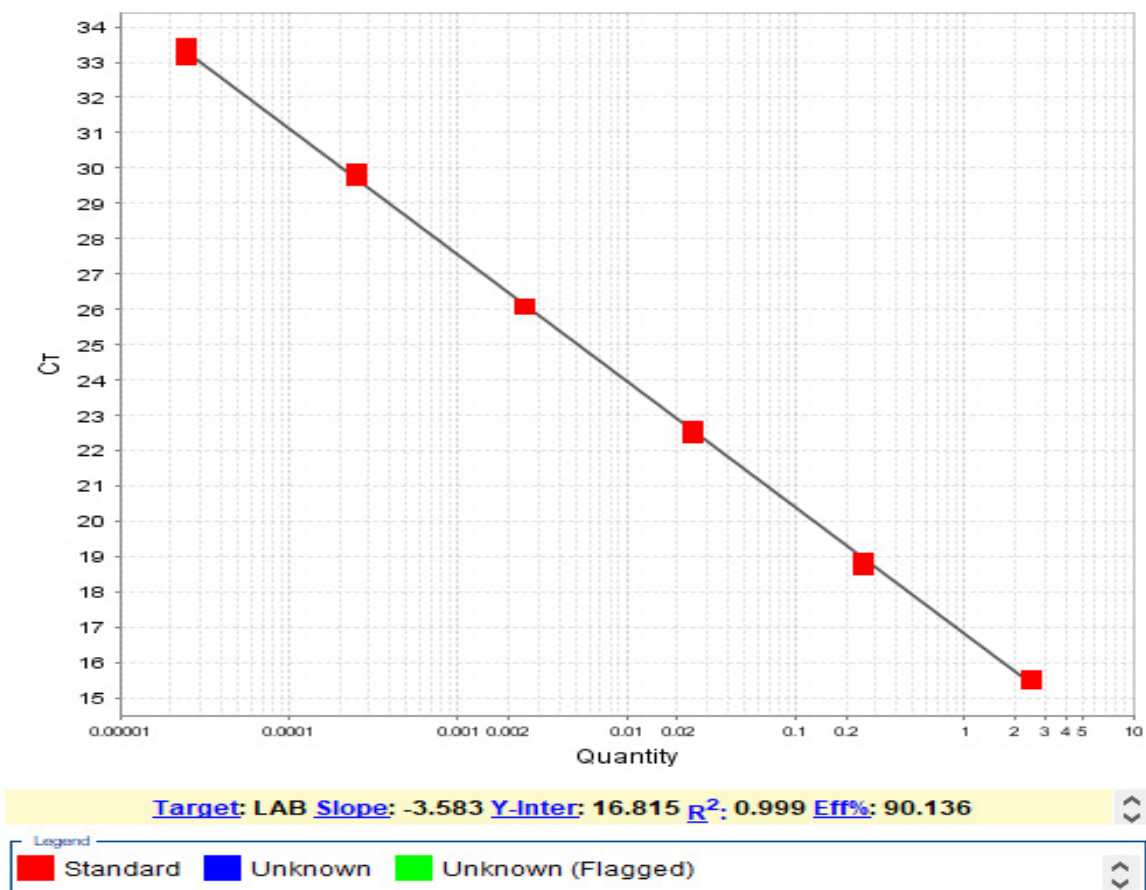
**Πίνακας 5.12** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό βακτηριακών πληθυσμών με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου

Βακτηριακός πληθυσμός	Αλληλουχία (5'-3')	Θερμοκρασία πρόσδεσης	Βιβλιογραφία
Ολικά βακτήρια	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	60 °C	Clifford <i>et al.</i> 2012
<i>Bacteroides spp.</i>	F: GAGAGGAAGGTCCCCAC R: CGCTACTTGGCTGGTTCAG	58 °C	Peinado <i>et al.</i> 2013
<i>Lactobacillus spp.</i>	F: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC R: GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC	60 °C	Delroisse <i>et al.</i> 2008, Peinado <i>et al.</i> 2013
<i>Bifidobacterium spp.</i>	F: CGCGTCYGGTGTGAAAG R: CCCACATCCAGCATCCA	58 °C	Delroisse <i>et al.</i> 2008, Peinado <i>et al.</i> 2013
<i>Escherichia coli</i>	F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA R: GGGTAACGTCAATGAGCAAAGG	60 °C	Silkie and Nelson 2009
<i>C. perfringens</i> subgroup ( <i>Clostridium</i> Cluster I)	F: TACCHRAGGAGGAAGCCAC R: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT	56 °C	Goodarzi Boroojeni <i>et al.</i> 2014
<i>C. leptum</i> subgroup ( <i>Clostridium</i> cluster IV)	F: GCACAAGCAGTGGAGT R: CTTCTCCGTTTTGTCAA	52 °C	Matsuki <i>et al.</i> 2004
<i>C. coccoides</i> subgroup ( <i>Clostridium</i> cluster XIVa)	F: ACTCCTACGGGAGGCAGC R: CTTCTTAGTCAGGTACCGTCAT	60 °C	Schwartz <i>et al.</i> 2010

#### 5.4.6.4 Πρότυπες καμπύλες αναφοράς

Για το σκοπό του ποσοτικού προσδιορισμού των βακτηριακών πληθυσμών στον ειλεό και στο τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς από βακτηριακά στελέχη απομονωμένα σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα (Εικόνα 5.14).





**Εικόνα 5.14.** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον πληθυσμό *Lactobacillus spp.*

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με τον υπό μελέτη βακτηριακό πληθυσμό και παρουσιάζονται στον πίνακα 5.13. Η διαδικασία ανασύστασης και ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.4.6.5. Για την ποσοτικοποίηση των βακτηριακών πληθυσμών το βακτηριακό γενωμικό DNA από καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους απομονώθηκε χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο πακέτο αντιδραστηρίων (PSP® Spin Stool DNA Kit, Stratec Molecular GmbH, Berlin Germany) με μία μικρή τροποποίηση. Η διαδικασία περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.4.6.2.

**Πίνακας 5.13.** Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών αναφοράς για την ανάλυση της PCR πραγματικού χρόνου

Στέλεχος αναφοράς	Υπό μελέτη βακτηριακοί πληθυσμοί	Αλληλουχία αναφοράς	Μέγεθος γενωμικού βακτηριακού DNA (Mbp)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ολικά βακτήρια και <i>Escherichia coli</i>	NZ_CP009072.1	5,13
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	<i>Clostridium perfringens</i> subgroup (Clostridium Cluster I)	NC_008261.1	3,26
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	<i>Bacteroides</i> spp.	NC_009614.1	5,16
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC 25527	<i>Bifidobacterium</i> spp.	NC_017834.1	1,93
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	<i>Clostridium leptum</i> subgroup (Clostridium cluster IV)	NZ_ABCB00000000.2	3,27
<i>Clostridium clostridioforme</i> DSM933	<i>C. coccooides</i> subgroup (Clostridium cluster XIVa)	NZ_FOOJ00000000.1	5,47
<i>L. acidophilus</i> ATCC 314	<i>Lactobacillus</i> spp.	NC_006814.3	1,99

Η αντιστοίχιση του ποσοτικού αποτελέσματος της PCR πραγματικού χρόνου σε αριθμό βακτηρίων έγινε βάσει προηγούμενων αναφορών Joly et al. (2006). Αναλυτικότερα, ο αριθμός των αντιγράφων του γενώματος καθενός από τις ομάδες, τα γένη και τα είδη βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν στο αρχικό απομονωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε για να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε με βάση ένα μέσο όρο μοριακού βάρους 660 Da για 1 bp



**Εικόνα 5.15.** Ανάπτυξη βακτηρίων του πληθυσμού *Bacteroides fragilis*

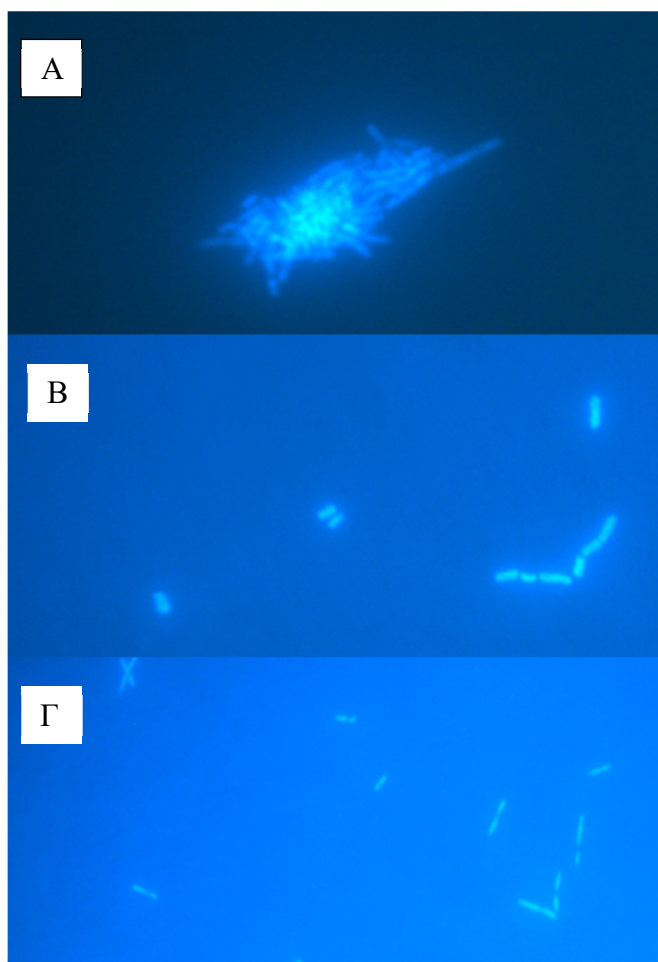
δίκλωνου DNA χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση: αριθμός αντιγράφων γενώματος = ποσότητα DNA (fg)/ μέσος όρος μάζας του αντίστοιχου γενώματος. Ο αριθμός των αντιγράφων του γενώματος αντιστοιχεί σε μία ισοδύναμη ποσότητα βακτηριακών κυττάρων. Τα μεγέθη των γενωμάτων για το σύνολο των βακτηριακών πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.13. Σε κάθε αντίδραση συμπεριλήφθηκε κατάλληλη πρότυπη καμπύλη

χρησιμοποιώντας μια σειρά από διαδοχικές αραιώσεις ( $10 \times$ ) γνωστής συγκέντρωσης γενωμικού DNA.

#### 5.4.6.5 Ανασύσταση και ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών

Για την ανασύσταση και ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών παρασκευάστηκαν υγρά γενικά υποστρώματα. Επίσης για κάθε βακτηριακό στέλεχος επιβεβαιώθηκε η χαρακτηριστική για κάθε είδος μορφολογία των βακτηριακών κυττάρων με μικροσκόπηση επιχρισμάτων που είχαν υποβληθεί σε χρώση βάσει της μεθόδου DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Εικόνα 5.16).

Η διαδικασία της ανασύστασης και ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών περιλάμβανε την παρασκευή θρεπτικού ζωμού όγκου 10 ml και τον άσηπτο ενοφθαλμισμό τους με 1 σφαιρίδιο



**Εικόνα 5.16.** Φωτογραφία επιχρίσματος βακτηρίων A) *Bacteroides fragilis* B) *Clostridium perfringens* Γ) *Clostridium clostridioforme* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής DAPI

(bead) αποθηκευμένου στους  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  βακτηριακού στελέχους. Ακολουθούσε επώαση των ενοφθαλμισμένων θρεπτικών υλικών στους  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  για 18 - 48 ώρες υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες ανάλογα το βακτηριακό στέλεχος και με περιοδική ήπια ανακίνηση προς αποφυγή ιζήματος. Μέρος του ζωμού αποθηκεύθηκε. Επιπλέον γίνονταν παράλληλη αποθήκευση δείγματος καλλιέργειας για τη μετέπειτα απομόνωση DNA με σκοπό την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με τον εξετασθέντα βακτηριακό πληθυσμό. Η επώαση των θρεπτικών υποστρωμάτων για τον πληθυσμό *E.coli* έγινε αερόβια για 24 ώρες. Ενώ τα τρυβλία για την καλλιέργεια των αναερόβιων, Gram+ κόκκων, των γενών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* και Gram- κόκκων του

γένους *Bacteroides* (Εικόνα 5.15) επώαστηκαν αναερόβια για 48 ώρες. Για την αναερόβια επώαση έγινε χρήση κατάλληλων καταλυτών (anaerocult) σε ερμητικά κλειστά δοχεία.

## 5.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Αρχικά έγινε εκτίμηση της κανονικότητας των δεδομένων που συγκεντρώθηκαν βάσει Kolmogorov-Smirnov. Στη συνέχεια τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας παραγοντική ανάλυση 2×2 για την 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη και 3×2 για τη 2<sup>η</sup>, χρησιμοποιώντας το γενικό γραμμικό πρότυπο (GLM). Τα πρωτογενή δεδομένα του προσδιορισμού των παραγωγικών χαρακτηριστικών και των συντελεστών της ειλεακής και ολικής φαινομένης πεπτικότητας και της κατακρατηθείσας ενέργειας αναλύθηκε σε επίπεδο κλωβού. Τα πρωτογενή δεδομένα της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας στον ειλέο και στα τυφλά έντερα, της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα σε συστημικό και τοπικό επίπεδο και της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την λειτουργία του εντερικού φραγμού στον ειλέο και στα τυφλά έντερα σε επίπεδο ορνιθίου. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) μεταξύ των επεμβάσεων αναλύθηκαν περαιτέρω και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το κριτήριο Duncan. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του λογισμικού SPSS για τα Windows Statistical Package Program, Version 8.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - 1<sup>η</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

#### 6.1 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης επί των παραγωγικών αποδόσεων

Στη φάση έναρξης και στη φάση ανάπτυξης, τα ορνίθια που κατανάλωσαν οξινιστή δεν παρουσίασαν σημαντική βελτίωση στην AZB και στο ΣΕ. Αντίθετα, στις δύο αυτές περιόδους η ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων είχε θετική επίδραση στην AZB ( $P_{AV} = 0,002$  και  $P_{AV} = 0,008$ ) και στο ΣΕ ( $P_{AV} = 0,001$  και  $P_{AV} = 0,012$ ), σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Στην τελική φάση, τα ορνίθια που κατανάλωσαν οξινιστή ή αβιλαμυκίνη παρουσίασαν στατιστικά σημαντική βελτίωση στην AZB ( $P_{AC} = 0,022$  και  $P_{AV} = 0,038$ ) καθώς και στο ΣΕ ( $P_{AC} = 0,012$  και  $P_{AV} = 0,001$ ). Επιπλέον, σημαντική αλληλεπίδραση της προσθήκης οξινιστή και αβιλαμυκίνη ( $AC \times AV$ ) σημειώθηκε στον ΣΕ ( $P_{AC \times AV} = 0,049$ ).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για το πείραμα συνολικά (42 ημέρες) έδειξε σημαντικές κύριες επιδράσεις της προσθήκης οξινιστή ή αβιλαμυκίνης. Αναλυτικότερα, τα ορνίθια που έλαβαν οξινιστή παρουσίασαν σημαντική αύξηση AZB ( $P_{AC} = 0,035$ ). Επιπρόσθετα, η προσθήκη αβιλαμυκίνης βελτίωσε σημαντικά την AZB ( $P_{AV} = 0,002$ ), τον ΣΕ ( $P_{AV} = 0,014$ ) και το δείκτη παραγωγικής αποδοτικότητας των ορνιθίων (ΔΠΑ;  $P_{AV} = 0,001$ ). Η προσθήκη οξινιστή ή αβιλαμυκίνης δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση ( $P > 0,05$ ) στην κατανάλωση τροφής, ανεξαρτήτως του σταδίου ανάπτυξης (Πίνακας 6.14).

Το ποσοστό επιβίωσης των ορνιθίων δεν επηρεάστηκε σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τις διατροφικές επεμβάσεις (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

**Πίνακας 6.14.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης επί των παραγωγικών αποδόσεων ανά φάση ανάπτυξης και συνολικά για όλο το πείραμα

	Εναρκτήριο (1 - 14 ημ)			Ανάπτυξης (15 - 28 ημ)			Πάχυνσης (29 - 42 ημ)			Συνολικά (1 - 42 ημ)			ΔΠΑ <sup>1</sup>	
	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB		
	Επίδραση <sup>2</sup>													
<b>Οξινιστής<sup>3</sup></b>	-	327,0	487,7	1,49	865,1	1518,3	1,77	1054,8	2218,4	2,11	2246,9	4224,5	1,88	280,4
	+	321,8	488,1	1,53	892,5	1525,3	1,71	1118,1	2215,7	2,00	2332,4	4229,1	1,83	297,7
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>4</sup></b>	-	308,6	484,5	1,58	855,4	1520,8	1,79	1058,0	2186,9	2,07	2221,9	4192,2	1,89	271,7
	+	340,2	491,4	1,44	902,3	1522,8	1,69	1114,9	2247,2	2,04	2357,4	4261,4	1,81	306,4
	Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>5</sup>													
<b>C</b>		314,3	489,4	1,56	844,3	1530,4	1,81	1002,0	2171,3	2,17b	2160,6	4191,1	1,94	254,3
<b>AC</b>		302,9	479,5	1,58	866,4	1511,2	1,74	1114,0	2202,5	1,98a	2283,3	4193,2	1,84	289,0
<b>ACAV</b>		340,7	496,7	1,46	918,6	1539,4	1,68	1122,3	2228,8	1,99a	2381,6	4264,9	1,79	306,3
<b>AV</b>		339,8	486,1	1,43	885,9	1506,2	1,70	1107,6	2265,6	2,05ab	2333,3	4257,9	1,82	306,5
	Στατιστικά													
<b>SEM<sup>6</sup></b>		9,01	10,65	0,033	16,43	29,88	0,040	26,19	34,32	0,039	38,65	58,47	0,031	9,77
<b>P<sub>AC</sub></b>		0,567	0,972	0,202	0,106	0,816	0,168	0,022	0,936	0,012	0,035	0,938	0,170	0,088
<b>P<sub>AV</sub></b>		0,002	0,520	0,001	0,008	0,949	0,012	0,038	0,090	0,001	0,002	0,246	0,014	0,001
<b>P<sub>AC x AV</sub></b>		0,499	0,343	0,580	0,749	0,388	0,438	0,074	0,330	0,049	0,345	0,967	0,170	0,085

<sup>1</sup>ΔΠΑ= [βιωσιμότητα (%) × ζών βάρος (kg) / ηλικία (ημ) × ΣΕ] × 100 σύμφωνα με τους Awad *et al.* (2008)

<sup>2</sup>Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου (BΣ) δίνεται στον πίνακα 5.6.

<sup>3</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>4</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>5</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από ν=8 κλωβούς ανά επέμβαση, C: BΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a,b: Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05)

<sup>6</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

## **6.2 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην ολική φαινομένη πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας**

Στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν στην πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και στο ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας σε ορνίθια που κατανάλωσαν οξινιστή ή αβιλαμυκίνη (Πίνακας 6.15). Αναλυτικότερα, η ενσωμάτωση οξινιστή βελτίωσε σημαντικά την πεπτικότητα της ξηράς ουσίας ( $\text{ΞΟ}$ ;  $P_{AC} = 0,050$ ) και της οργανικής ουσίας ( $\text{ΟΟ}$ ;  $P_{AC} = 0,045$ ), καθώς επίσης το ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας ( $P_{AC} = 0,020$ ). Επιπλέον, τα ορνίθια που κατανάλωσαν αβιλαμυκίνη παρουσίασαν σημαντικά καλύτερη πεπτικότητα της  $\text{ΞΟ}$  ( $P_{AV} = 0,018$ ), των  $\text{ΟΟ}$  ( $P_{AV} = 0,013$ ), των λιπαρών ουσιών ( $\text{ΛΟ}$ ;  $P_{AV} = 0,022$ ) και των αζωτούχων ουσιών ( $\text{ΑΟ}$ ;  $P_{AV} = 0,042$ ) και κατακράτησαν μεγαλύτερο του ποσοστό ενέργειας ( $P_{AV} = 0,012$ ). Καμία σημαντική αλληλεπίδραση του οξινιστή και της αβιλαμυκίνης σημειώθηκε ( $P > 0,05$ ) στις παραμέτρους που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 6.15.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην ολική πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και στο ποσοστό της κατακρατηθείσας ενέργειας

		Ξηρά ουσία	Τέφρα	Οργανική ουσία	Λιπαρές ουσίες	Αζωτούχες ουσίες <sup>1</sup>	ΕΝΕΟ <sup>2</sup>	Κατακρατηθείσα ενέργεια
Επίδραση <sup>3</sup>								
Οξινιστής <sup>4</sup>	-	68,4	25,4	71,3	56,9	58,8	83,0	63,8
	+	72,1	34,5	74,7	63,8	66,8	83,8	69,4
Αβιλαμυκίνη <sup>5</sup>	-	67,9	26,6	70,8	54,7	57,7	82,5	63,5
	+	72,6	33,4	75,2	66,0	67,9	84,3	69,7
Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>6</sup>								
C		65,0	20,4	68,2	49,6	53,2	81,3	59,3
AC		70,7	32,8	73,4	59,8	62,1	83,8	67,7
ACAV		73,5	36,3	76,1	67,7	71,4	83,8	71,1
AV		71,7	30,5	74,4	64,3	64,3	84,8	68,3
Στατιστικά								
SEM <sup>7</sup>		1,71	4,95	1,53	4,29	4,29	1,39	2,09
P <sub>AC</sub>		0,050	0,092	0,045	0,137	0,100	0,603	0,020
P <sub>AV</sub>		0,018	0,193	0,013	0,022	0,042	0,217	0,012
P <sub>AC x AV</sub>		0,277	0,514	0,272	0,445	0,839	0,235	0,215

<sup>1</sup>Οι τιμές της ολικής φαινομένη πεπτικότητας των αζωτούχων ουσιών έχουν διορθωθεί για το ουρικό οξύ στα περιττώματα

<sup>2</sup>Ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες

<sup>3</sup>Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου (ΒΣ) δίνεται στον πίνακα 5.6.

<sup>4</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>5</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>6</sup> Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από v=4 κλωβούς ανά επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>7</sup> SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

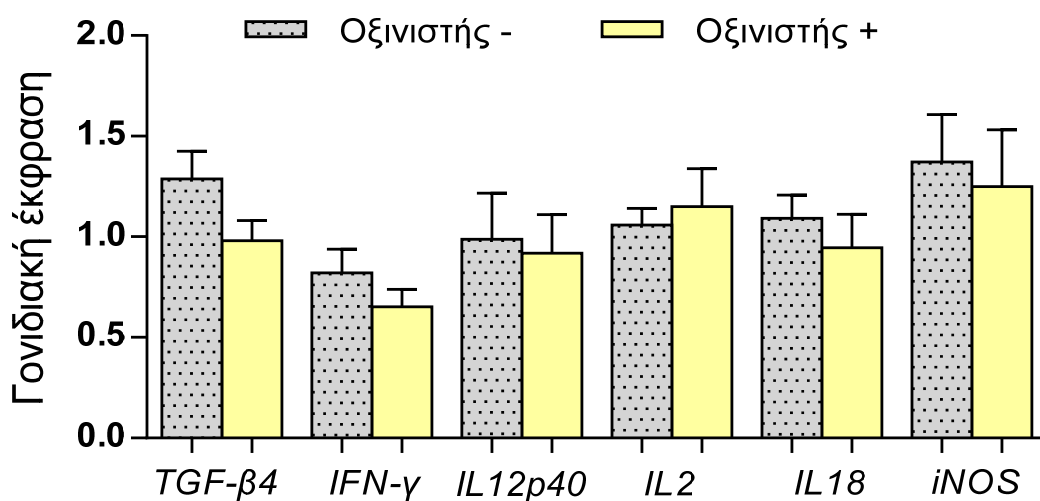


### 6.3 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα σε δευτερογενείς λεμφαδένες ορνιθίων 42 ημερών

Στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών εκτιμήθηκε η έκφραση των *TGF-β4*, *IFN-γ*, *IL12p40*, *IL18*, *IL2* και *iNOS* (Διαγράμματα 6.1 και 6.2) ενώ στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου εκτιμήθηκε η γονιδιακή έκφραση των *TGF-β4*, *IFN-γ*, *IL10*, *IL18*, *IL22* και *iNOS* (Διαγράμματα 6.3, 6.4 και 6.5). Ο προσδιορισμός της *IL10* στο σπλήνα και των *IL12p40* και *IL2* στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου δεν ήταν εφικτός, διότι ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνταν για να ανιχνευτεί το σήμα φθορισμού σε εκθετική φάση αντίδρασης ήταν αρκετά υψηλός (>30).

#### Σπλήνας

Η προσθήκη οξινιστή στο σιτηρέσιο ορνιθίων δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές ( $P > 0,05$ ) στην έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στον σπλήνα.

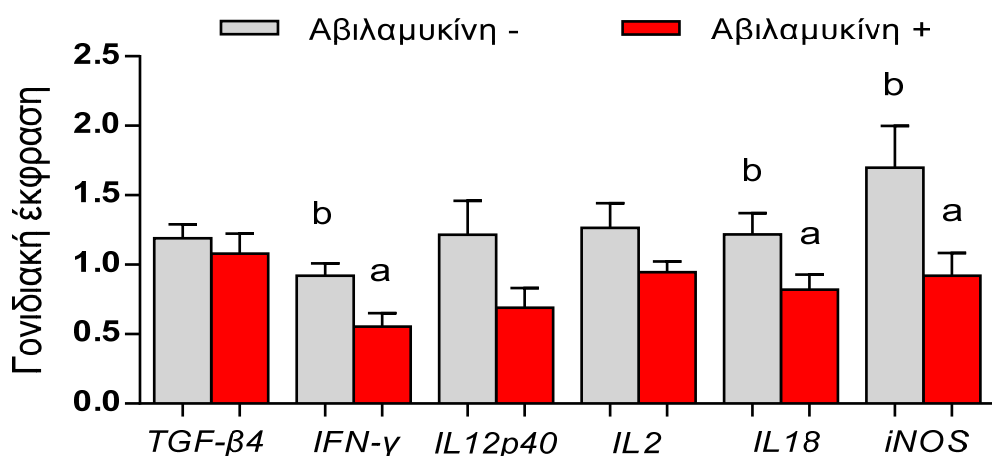


**Διάγραμμα 6.1.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή στην έκφραση των γονιδίων *TGF-β4*, της *IFN-γ*, της *IL12p40*, της *IL2*, της *IL18* και της *iNOS* στον σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών

Αντίθετα, τα ορνίθια που κατανάλωσαν αβιλαμυκίνη παρουσίασαν σημαντική μείωση της έκφρασης της *IFN-γ* ( $P_{AV} = 0,010$ ), της *IL18* ( $P_{AV} = 0,048$ ) και της *iNOS* ( $P_{AV} = 0,035$ ). Επιπλέον, δε σημειώθηκε σημαντική ( $P > 0,05$ ) αλληλεπίδραση της ενσωμάτωσης οξιμιστή και αβιλαμυκίνης στην έκφραση των γονιδίων που προσδιορίστηκαν.

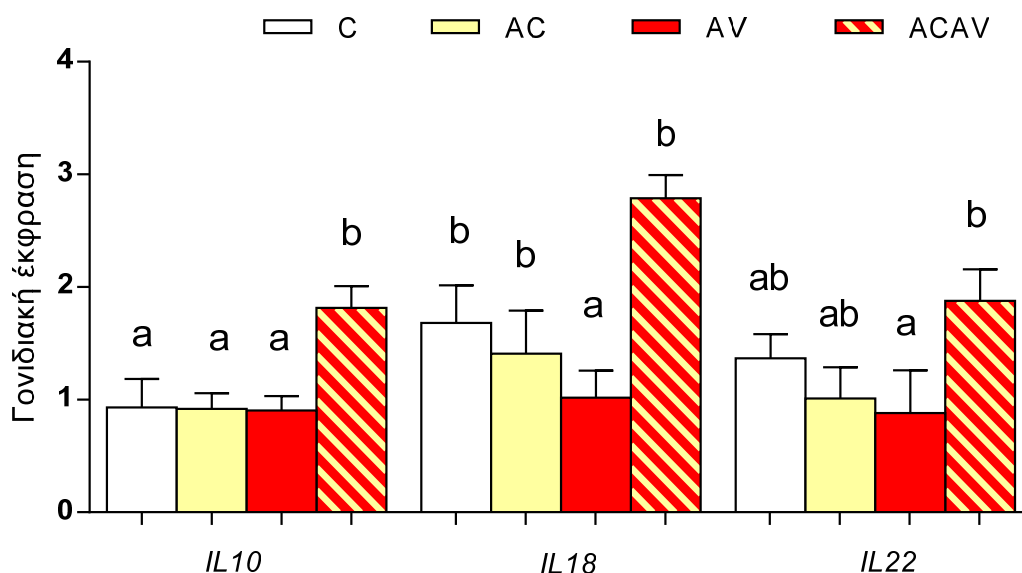
#### Δευτερογενείς λεμφαδένες τυφλού εντέρου

Ο συνδυασμός του οξιμιστή με την αβιλαμυκίνη έχει στατιστικά σημαντική επίπτωση στην έκφραση των *IL10* ( $P_{AC \times AV} = 0,018$ ), *IL18* ( $P_{AC \times AV} = 0,002$ ) και *IL22* ( $P_{AC \times AV} = 0,030$ ) στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών (Διάγραμμα 6.3).



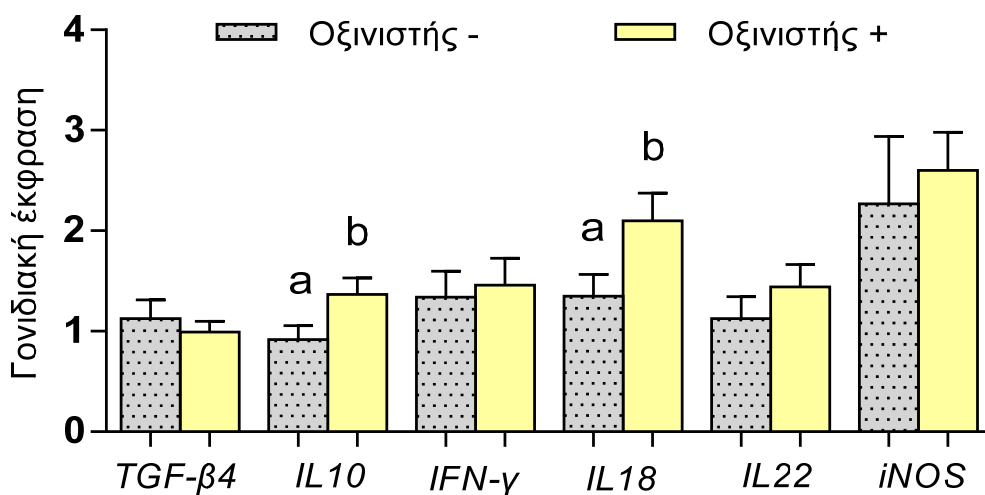
**Διάγραμμα 6.2.** Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στη γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IFN-γ*, της *IL12p40*, της *IL2*, της *IL18* και της *iNOS* στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

Αναλυτικότερα, τα ορνίθια που κατανάλωσαν το συνδυασμό των δύο πρόσθετων (ACAV) παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση της *IL10* και της *IL18* σε σύγκριση με τα ορνίθια που, κατανάλωσαν μόνο AV ή μόνο το βασικό σιτηρέσιο (επέμβαση C).



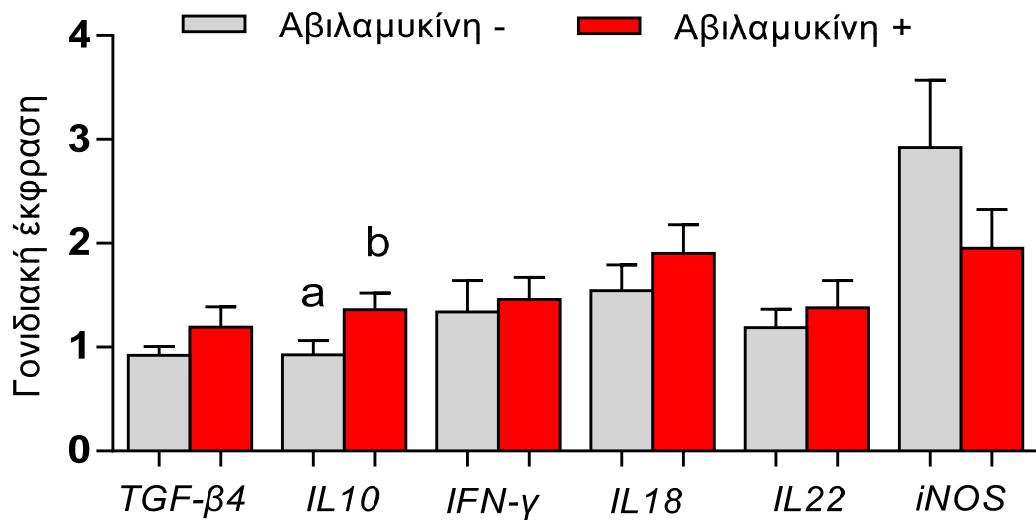
**Διάγραμμα 6.3.** Αλληλεπίδραση της προσθήκης οξινοστή και αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση της *IL10*, της *IL18* και της *IL22*. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a,b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

Επιπρόσθετα, η έκφραση της *IL22* αυξήθηκε στα ορνίθια που κατανάλωσαν ACAV σε σύγκριση με τα ορνίθια που έλαβαν μόνο AV.



**Διάγραμμα 6.4.** Επίδραση της προσθήκης οξινοστή στη γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IL10*, της *IFN-γ*, της *IL18*, της *IL22* και της *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

Τα ορνίθια που κατανάλωσαν οξινιστή ή αβιλαμυκίνη παρουσίασαν διαφορετικό μοτίβο έκφρασης των κυτταροκινών *IL10* και *IL18*. Αναλυτικότερα, το επίπεδο έκφρασης της *IL10* και της *IL18* αυξήθηκε σημαντικά ( $P_{AC} = 0,022$  και  $P_{AC} = 0,018$ , αντίστοιχα) μετά από τη χορήγηση οξινιστή καθώς και της *IL10* ( $P_{AV} = 0,026$ ) μετά από τη χορήγηση αβιλαμυκίνης (Διάγραμμα 6.4).



**Διάγραμμα 6.5.** Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IL10*, της *IFN-γ*, της *IL18*, της *IL22* και της *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

#### **6.4 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλεό και στα τυφλά έντερα**

##### ***Ειλεακό περιεχόμενο***

Η συγκέντρωση της ομάδας *C. perfringens* subgroup μειώθηκε σημαντικά ( $P_{AV} = 0,045$ ) στο περιεχόμενο του ειλεού μετά την ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο. Αντιθέτως, η προσθήκη οξινιστή ή αβιλαμυκίνης δεν είχε επίδραση ( $P > 0,05$ ) στη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων και στους βακτηριακούς πληθυσμούς που ανήκουν στις ομάδες *C. coccoides* subgroup και *C. leptum* subgroup, στα γένη *Bacteroides spp.* και *Lactobacillus spp.*, και στο είδος *Escherichia coli*, στο ειλεακό περιεχόμενο ορνιθίων 42 ημερών (Πίνακας 6.16).

##### ***Επιθήλιο του ειλεακού βλεννογόνου***

Ο συνδυασμός του οξινιστή με την αβιλαμυκίνη έχει στατιστικά σημαντική επίπτωση ( $P_{AC \times AV} = 0,028$ ) στη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων που σχετίζονται με το βλεννογόνο του επιθηλιακού ιστού του ειλεού. Πιο αναλυτικά, τα ολικά βακτήρια μειώθηκαν στα ορνίθια που κατανάλωσαν οξινιστή και αβιλαμυκίνη (ACAV) σε συνδυασμό, σε σύγκριση με τα ορνίθια που έλαβαν μόνο AV (Πίνακας 6.17).

##### ***Περιεχόμενο των τυφλών εντέρων***

Η συγκέντρωση των ομάδων *C. coccoides* subgroup και *C. leptum* subgroup αυξήθηκε σημαντικά ( $P_{AC} = 0,040$  και  $P_{AC} = 0,018$ , αντίστοιχα) στο τυφλικό περιεχόμενο με τη διαιτητική χορήγηση οξινιστή. Σε αντίθεση, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ) στη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων, των ομάδων *C. perfringens* subgroup, *C. coccoides* subgroup και *C. leptum* subgroup, των γενών *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.* και *Bifidobacterium spp.* στα ορνίθια που έλαβαν αβιλαμυκίνη (Πίνακας 6.18).

##### ***Επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων***

Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ) στη συγκέντρωση των υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών στον βλεννογόνο των τυφλών εντέρων ορνιθίων που κατανάλωσαν οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνη (Πίνακας 6.19).

**Πίνακας 6.16.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών του περιεχομένου του ειλεού (log βακτηριακών κυττάρων / g υγρού περιεχομένου)

		<b>Ολικά βακτήρια</b>	<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>C. perfringens subgroup</i>	<i>C. coccoides subgroup</i>	<i>C. leptum subgroup</i>
		Επίδραση						
<b>Οξινιστής<sup>1</sup></b>	-	8,12	5,76	7,43	5,90	6,42	6,71	5,44
	+	8,13	5,92	7,46	6,10	6,68	6,94	5,48
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>	-	8,11	5,98	7,58	6,23	6,88	6,88	5,52
	+	8,14	5,69	7,30	5,77	6,22	6,77	5,41
		Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>						
<b>C</b>		8,05	5,84	7,47	6,21	6,85	6,88	5,45
<b>AC</b>		8,17	6,12	7,70	6,25	6,90	6,88	5,58
<b>ACAV</b>		8,09	5,72	7,22	5,95	6,45	7,00	5,38
<b>AV</b>		8,19	5,67	7,38	5,58	5,98	6,54	5,44
		Στατιστικά						
<b>SEM<sup>4</sup></b>		0,116	0,259	0,242	0,287	0,314	0,132	0,138
<b>P<sub>AC</sub></b>		0,958	0,538	0,894	0,491	0,421	0,095	0,759
<b>P<sub>AV</sub></b>		0,827	0,271	0,258	0,116	0,045	0,414	0,440
<b>P<sub>AC x AV</sub></b>		0,363	0,668	0,429	0,563	0,509	0,099	0,483

<sup>1</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>3</sup> Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n=8 κλωβούς ανά επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 6.17.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του ειλεακού βλεννογόνου (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)

		Ολικά βακτήρια	<i>C. coccoides</i> subgroup	<i>Lactobacillus spp.</i>
			Επίδραση	
Οξινιστής <sup>1</sup>	-	7,19	6,09	5,81
	+	7,09	6,07	5,75
Αβιλαμυκίνη <sup>2</sup>	-	7,14	6,15	5,85
	+	7,14	6,00	5,72
			Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>	
C		7,07ab	5,96	5,73
AC		7,22ab	6,34	5,96
ACAV		6,97a	5,79	5,54
AV		7,31b	6,21	5,90
			Στατιστικά	
SEM <sup>4</sup>		0,106	0,233	0,184
P <sub>AC</sub>		0,368	0,931	0,731
P <sub>AV</sub>		0,956	0,525	0,485
P <sub>AC x AV</sub>		0,028	0,096	0,124

<sup>1</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n=8 κλωβούς ανά επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a, b: Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05)

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 6.18.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών του περιεχομένου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων / g υγρού περιεχομένου)

		<b>Ολικά βακτήρια</b>	<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>C. perfringens subgroup</i>	<i>C. coccooides subgroup</i>	<i>C. leptum subgroup</i>
Επίδραση									
<b>Οξινιστής<sup>1</sup></b>	-	10,12	9,52	7,08	5,37	7,13	7,03	9,25	9,28
	+	10,20	9,61	7,17	5,26	7,16	7,32	9,40	9,47
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>	-	10,16	9,57	7,14	5,46	7,02	7,15	9,32	9,36
	+	10,16	9,56	7,11	5,18	7,28	7,20	9,33	9,38
Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>									
<b>C</b>		10,07	9,47	7,01	5,50	7,03	6,97	9,18	9,24
<b>AC</b>		10,25	9,67	7,27	5,41	7,00	7,32	9,46	9,49
<b>ACAV</b>		10,14	9,55	7,07	5,11	7,32	7,32	9,34	9,45
<b>AV</b>		10,17	9,56	7,15	5,24	7,23	7,08	9,32	9,31
Στατιστικά									
<b>SEM<sup>4</sup></b>		0,067	0,084	0,244	0,258	0,173	0,197	0,070	0,077
<b>P<sub>AC</sub></b>		0,270	0,278	0,711	0,654	0,854	0,143	0,040	0,018
<b>P<sub>AV</sub></b>		0,943	0,875	0,904	0,291	0,147	0,773	0,886	0,831
<b>P<sub>AC x AV</sub></b>		0,127	0,213	0,502	0,940	0,726	0,756	0,071	0,437

<sup>1</sup> Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>2</sup> Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>3</sup> Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n=8 κλωβούς ανά επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup> SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.



**Πίνακας 6.19.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)

		<b>Ολικά βακτήρια</b>	<b><i>Bacteroides spp.</i></b>	<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>	<b><i>C. coccoides</i> subgroup</b>	<b><i>C. leptum</i> subgroup</b>
<i>Επίδραση</i>						
<b>Οξινιστής<sup>2</sup></b>	-	8,56	7,98	5,37	7,76	8,02
	+	8,59	8,00	5,50	7,72	8,11
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>3</sup></b>	-	8,52	7,94	5,41	7,65	7,96
	+	8,63	8,04	5,46	7,82	8,16
<i>Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις)<sup>3</sup></i>						
<b>C</b>		8,55	7,95	5,73	7,76	7,98
<b>AC</b>		8,49	7,92	5,77	7,56	7,95
<b>ACAV</b>		8,70	8,08	5,91	7,88	8,27
<b>AV</b>		8,57	8,00	5,69	7,77	8,05
<i>Στατιστικά</i>						
<b>SEM<sup>4</sup></b>		0,158	0,169	0,229	0,148	0,161
<b>P<sub>AC</sub></b>		0,828	0,902	0,578	0,787	0,579
<b>P<sub>AV</sub></b>		0,469	0,545	0,842	0,263	0,228
<b>P<sub>AC x AV</sub></b>		0,574	0,754	0,699	0,319	0,435

<sup>1</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>2</sup> Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>3</sup> Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από ν=8 κλωβούς ανά επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup> SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

## 6.5 Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού

### Ειλεός

Το αποτέλεσμα της εκτίμησης της έκφρασης των γονιδίων *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4* παρουσιάζεται στον πίνακα 6.20. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ) στην σχετική έκφραση των *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4* στον ειλεό όταν χορηγήθηκε συνδυαστικά ο οξινιστής και η αβιλαμυκίνη. Αντιθέτως, κατά τη προσθήκη του οξινιστή και αβιλαμυκίνης παρουσιάστηκε αλληλεπίδραση στην γονιδιακή έκφραση του *ZO1* ( $P_{AC \times AV} = 0,007$ ), *ZO2* ( $P_{AC \times AV} = 0,027$ ), *CLDN1* ( $P_{AC \times AV} = 0,040$ ), και *CLDN5* ( $P_{AC \times AV} = 0,015$ ). Αναλυτικότερα, τα ορνίθια των επεμβάσεων C παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση *ZO1* σε σύγκριση με αυτήν των υπόλοιπων επεμβάσεων. Η γονιδιακή έκφραση *ZO2* ήταν υψηλότερη στην επέμβαση C σε σύγκριση με τις επεμβάσεις AC και AV, ενώ η ACAV πήρε ενδιάμεσες τιμές. Τα επίπεδα της έκφρασης της *CLDN1* παρουσιάστηκαν χαμηλότερα στην επέμβαση AV σε σχέση με την C, ενώ οι επεμβάσεις AC και ACAV έλαβαν ενδιάμεσες τιμές. Ακόμα, τα ορνίθια των επεμβάσεων ACAV και C σημείωσαν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης *CLDN5* σε σχέση με την AV, ενώ η επέμβαση AC ήταν ενδιάμεση.

Η προσθήκη αβιλαμυκίνης δεν επηρέασε την έκφραση των *ZO2*, *CLDN1* και *CLDN5* ( $P > 0,05$ ). Επίσης, δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των *IgA*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4* μετά την κατανάλωση οξινιστή. Σε αντίθεση, η ενσωμάτωση οξινιστή επέφερε μείωση στην σχετική έκφραση της *ZO1* ( $P_{AC} = 0,016$ ).

### Τυφλά έντερα

Η κατανάλωση αβιλαμυκίνης ή οξινιστή δεν είχε σημαντική επίδραση ( $P > 0,05$ ) στην έκφραση των *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4* (Πίνακας 6.21) στα τυφλά έντερα. Επίσης, δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ) της ενσωμάτωσης οξινιστή και αβιλαμυκίνης επί της σχετικής έκφρασης των *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4*.

**Πίνακας 6.20.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού του ειλεού

		<i>ZO1</i>	<i>ZO2</i>	<i>CLDN1</i>	<i>CLDN5</i>	<i>OCLN</i>	<i>NFKB1</i>	<i>TLR2B</i>	<i>TLR4</i>
		Επίδραση							
<b>Οξινιστής<sup>1</sup></b>	-	1,89	1,52	1,32	1,79	1,52	1,23	1,97	2,07
	+	1,00	1,10	1,38	0,83	0,99	1,24	1,47	1,16
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>	-	1,88	1,42	1,64	1,86	1,60	1,55	2,49	2,25
	+	1,01	1,20	1,05	0,77	0,91	0,92	0,96	0,97
		Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>							
<b>C</b>		2,82b	2,03b	2,06b	2,67b	2,14	1,74	3,06	3,11
<b>AC</b>		0,94a	0,81a	1,23ab	1,04a	1,07	1,35	1,92	1,39
<b>ACAV</b>		1,07a	1,40ab	1,53ab	0,62a	0,91	1,12	1,02	0,92
<b>AV</b>		0,95a	1,02a	0,57a	0,92a	0,90	0,72	0,89	1,02
		Στατιστικά							
<b>SEM<sup>4</sup></b>		0,344	0,341	0,334	0,331	0,295	0,262	0,565	0,490
<b>P<sub>AC</sub></b>		0,016	0,228	0,859	0,003	0,169	0,974	0,381	0,073
<b>P<sub>AV</sub></b>		0,016	0,533	0,085	0,001	0,018	0,024	0,011	0,014
<b>P<sub>AC x AV</sub></b>		0,007	0,027	0,012	0,036	0,125	0,140	0,272	0,110

<sup>1</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής.

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από ν=8 κλωβούς ανά επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a,b: Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (a,b) διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05).

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 6.21.** Επίδραση της προσθήκης οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού των τυφλών εντέρων

		<i>ZO1</i>	<i>ZO2</i>	<i>CLDN1</i>	<i>CLDN5</i>	<i>OCLN</i>	<i>NFKB1</i>	<i>TLR2B</i>	<i>TLR4</i>
		Επίδραση							
<b>Οξινιστής<sup>1</sup></b>	-	1,24	1,20	1,29	1,07	1,29	1,11	1,17	1,03
	+	1,32	1,05	1,01	1,31	1,27	1,48	1,46	1,48
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>	-	1,11	1,09	1,23	1,07	1,02	1,28	1,29	1,11
	+	1,45	1,16	1,27	1,30	1,53	1,31	1,35	1,40
		Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>							
<b>C</b>		1,12	1,32	1,32	0,86	1,27	1,34	1,00	0,72
<b>AC</b>		1,10	0,85	1,14	1,29	0,79	1,21	1,58	1,49
<b>ACAV</b>		1,55	1,24	1,29	1,33	1,74	1,74	1,34	1,47
<b>AV</b>		1,35	1,07	1,26	1,27	1,31	0,87	1,35	1,33
		Στατιστικά							
<b>SEM<sup>4</sup></b>		0,338	0,222	0,319	0,279	0,378	0,322	0,346	0,309
<b>P<sub>AC</sub></b>		0,795	0,509	0,813	0,391	0,852	0,259	0,411	0,157
<b>P<sub>AV</sub></b>		0,327	0,751	0,883	0,417	0,154	0,931	0,866	0,350
<b>P<sub>AC x AV</sub></b>		0,736	0,161	0,745	0,522	0,211	0,130	0,401	0,323

<sup>1</sup>Οξινιστής - : χωρίς προσθήκη οξινιστή, Οξινιστής + : προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης, Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις): από 8 ορνίθια/ επέμβαση, C: ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη, AC: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής, ACAV: προσθήκη 1 g οξινιστή / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - 2<sup>η</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

### 7.1 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Κατά τη πρώτη φάση (έναρξη) της πειραματικής μελέτης δεν διαπιστώθηκε σημαντική κύρια επίδραση ( $P > 0,05$ ) του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή της ενσωμάτωσης της αβιλαμυκίνης καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση στις παραμέτρους που εξετάστηκαν (Πίνακας 7.22)

Κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης (15 με 28 ημέρες) η ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο ορνιθίων βελτίωσε σημαντικά την AZB και το ΣΕ ( $P_{AV} < 0,001$ ). Σημαντική αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης σημειώθηκε στην AZB ( $P_{PF \times AV} = 0,022$ ). Αναλυτικότερα η επέμβαση CoN+A έλαβε την υψηλότερη τιμή (990 g / ορνίθιο), συγκριτικά με τις επεμβάσεις ViP, InP και CoN, ενώ οι επεμβάσεις ViP+A (955 g / ορνίθιο) και InP+A (944 g / ορνίθιο) έλαβαν ενδιάμεσες τιμές και διέφεραν από την επέμβαση CoN (872 g / ορνίθιο).

Στην τελική φάση, δεν σημειώθηκε αλληλεπίδραση ( $P > 0,05$ ) του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της ενσωμάτωσης της αβιλαμυκίνης. Αντίθετα, σημαντική κύρια επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή της ενσωμάτωσης της αβιλαμυκίνης παρουσιάστηκε στην AZB ( $P_{PF} = 0,006$ ,  $P_{AV} = 0,005$ , αντίστοιχα) και στο ΣΕ ( $P_{PF} < 0,001$ ,  $P_{AV} = 0,005$ , αντίστοιχα). Αναλυτικότερα, τα ορνίθια που έλαβαν ζωντανό ή αδρανοποιημένο τύπο προβιοτικού εμφάνισαν υψηλότερη AZB και βελτιωμένο ΣΕ σε σύγκριση με αυτά που δεν έλαβαν προβιοτικό. Επιπρόσθετα, τα ορνίθια που έλαβαν αβιλαμυκίνη σημείωσαν κατά 13,03 μεγαλύτερη AZB και καλύτερο ΣΕ κατά 7,98 % σε σύγκριση με αυτά που δεν έλαβαν αβιλαμυκίνη.

Για τη χρονική περίοδο 1 - 42 ημέρες που διήρκησε το πείραμα, σημαντική κύρια επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή της χορήγησης αβιλαμυκίνης παρουσιάστηκε στην AZB ( $P_{PF} = 0,015$ ,  $P_{AV} < 0,001$ ) στο ΣΕ ( $P_{PF} < 0,001$ ,  $P_{AV} < 0,001$ ) και στο δείκτη παραγωγικής αποδοτικότητας (ΔΠΑ;  $P_{PF} = 0,001$  και  $P_{AV} = 0,001$ ). Αναλυτικότερα, η προσθήκη αδρανοποιημένου ή ζωντανού προβιοτικού τύπου ή αβιλαμυκίνης βελτίωσε όλες τις παραμέτρους που προαναφέρθηκαν. Επιπρόσθετα, δεν σημειώθηκε αλληλεπίδραση του τύπου του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν για τις 42 μέρες του πειράματος.

Η κατανάλωση τροφής δεν παρουσίασε σημαντική αλλαγή ( $P > 0,05$ ) για τις τρεις φάσεις του πειράματος ούτε συνολικά.

Η συνολική θνησιμότητα των ορνιθίων ήταν 2,7 % και δε σημειώθηκε σημαντική κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση  $PF \times AV$  (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

**Πίνακας 7.22.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της χορήγησης αβιλαμυκίνης επί των παραγωγικών αποδόσεων ανά φάση ανάπτυξης και συνολικά για όλο το πείραμα

	Εναρκτήριο (1 <sup>η</sup> - 14 <sup>η</sup> ημ)			Ανάπτυξης (15 <sup>η</sup> - 28 <sup>η</sup> ημ)			Πάχυνσης (29 <sup>η</sup> - 42 <sup>η</sup> ημ)			Συνολικά (1 <sup>η</sup> - 42 <sup>η</sup> ημ)			ΔΠΑ <sup>1</sup>
	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	AZB g/ορνίθιο	KT g/ορνίθιο	ΣΕ KT/AZB	
<b>Τύπος προσθήκης</b>													
Χωρίς	378	486	1,29	931	1572	1,70	950A	2076	2,21B	2259A	4134	1,84B	219A
Ζωντανό	387	497	1,29	936	1548	1,66	1058B	2116	2,01A	2380B	4161	1,75A	282B
Αδρανοποιημένο	378	487	1,28	930	1519	1,64	1133B	2135	1,90A	2441B	4140	1,70A	305B
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>4</sup></b>													
-	378	487	1,29	902	1546	1,72	982	2063	2,13	2262	4096	1,82	239
+	384	492	1,28	963	1547	1,61	1111	2155	1,96	2458	4194	1,71	299
<i>Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις)<sup>5</sup></i>													
<b>CoN</b>	369	482	1,31	872a	1561	1,79	864	2012	2,32	2105	4055	1,93	177
<b>CoN+A</b>	387	489	1,27	990c	1584	1,60	1036	2141	2,07	2412	4213	1,75	261
<b>ViP</b>	390	498	1,28	916ab	1554	1,70	1003	2076	2,07	2309	4128	1,79	261
<b>ViP+A</b>	384	496	1,29	955bc	1543	1,62	1112	2156	1,94	2452	4195	1,71	304
<b>InP</b>	376	480	1,28	916ab	1524	1,66	1079	2102	1,95	2371	4106	1,73	278
<b>InP+A</b>	381	491	1,29	944bc	1515	1,61	1186	2168	1,83	2510	4173	1,67	333
<i>Στατιστικά</i>													
<b>SEM<sup>6</sup></b>	7,80	11,44	0,022	16,22	25,01	0,029	51,18	56,07	0,067	58,73	74,04	0,030	20,5
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,420	0,510	0,990	0,930	0,130	0,110	0,006	0,570	< 0,001	0,015	0,930	< 0,001	0,001
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,380	0,590	0,720	< 0,001	0,970	< 0,001	0,005	0,060	0,005	< 0,001	0,120	< 0,001	0,001
<b>P<sub>PFxAV</sub></b>	0,340	0,830	0,360	0,022	0,760	0,070	0,770	0,840	0,460	0,280	0,780	0,120	0,590

<sup>1</sup> ΔΠΑ= [βιωσιμότητα (%) × ζών βάρος (kg) / ηλικία (ημ) × ΣΕ] × 100 σύμφωνα με τους Awad *et al.* (2008).

<sup>2</sup> Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου (BΣ) δίνεται στον πίνακα 5.8.

<sup>3</sup> Χωρίς: BΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής. A,B: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (A,B) διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05).

<sup>4</sup> Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>5</sup> Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n= 5 κλωβούς ανά επέμβαση, CoN: BΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a-c: Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (a-c) διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05).

<sup>6</sup> SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

## **7.2 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων στην ειλεακή και ολική πεπτικότητα ορνιθίων 42 ημερών**

### ***Ειλεακή πεπτικότητα***

Στην πεπτικότητα της ΞΟ παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης ( $P_{PF \times AV} < 0,001$ ). Αναλυτικότερα, τα ορνίθια των επεμβάσεων CoN και ViP+A είχαν χαμηλότερη πεπτικότητα ΞΟ σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, ενώ της επέμβασης InP την υψηλότερη (Πίνακας 7.23). Η ενσωμάτωση του αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου στο σιτηρέσιο βελτίωσε σημαντικά την πεπτικότητα της ΞΟ ( $P_{PF} < 0,001$ ) και των ΟΑ ( $P_{PF} < 0,001$ ) σε σύγκριση με το σιτηρέσιο που δεν περιείχε προβιοτικό ή περιείχε ζωντανό προβιοτικό τύπο. Δεν υπήρξε σημαντική κύρια επίδραση ( $P > 0,05$ ) της προσθήκης αβιλαμυκίνης για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στην ειλεακή πεπτικότητα.

### ***Ολική πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και ποσοστό κατακρατηθείσας ενέργειας***

Ο συνδυασμός του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης επέδρασε στην πεπτικότητα της ΞΟ ( $P_{PF \times AV} < 0,001$ ) και των ΛΟ ( $P_{PF \times AV} < 0,001$ ). Πιο συγκεκριμένα, οι επεμβάσεις CoN και ViP+A είχαν χαμηλότερη πεπτικότητα ΞΟ σε σύγκριση με τις επεμβάσεις ViP και CoN+A, ενώ η επέμβαση InP+A σημείωσε την υψηλότερη. Επιπρόσθετα, η πεπτικότητα των ΛΟ παρουσίασε υψηλότερες τιμές στις επεμβάσεις InP και InP+A σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, με την επέμβαση CoN να σημειώνει τη χαμηλότερη (Πίνακας 7.23).

Ο τύπος προσθήκης του προβιοτικού είχε σημαντική επίπτωση στη πεπτικότητα των ΛΟ ( $P_{PF} < 0,001$ ). Τα ορνίθια που κατανάλωσαν αδρανοποιημένο προβιοτικό τύπο καθώς και ζωντανό είχαν σημαντικά υψηλότερη πεπτικότητα ΛΟ σε σύγκριση με αυτά που δεν κατανάλωσαν προβιοτικό.

Όσον αφορά τη πεπτικότητα των ΑΟ, εμφανίστηκε σημαντικά μειωμένη στα ορνίθια που έλαβαν ζωντανό προβιοτικό τύπο σε σύγκριση με αυτά που έλαβαν αδρανοποιημένο ή δεν έλαβαν προβιοτικό.

Δεν υπήρξε επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή της αβιλαμυκίνης ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων ( $P > 0,05$ ) στο ποσοστό της κατακρατηθείσας ενέργειας.



**Πίνακας 7.23.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της χορήγησης αβιλαμυκίνης στην ειλεακή και ολική πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών και στο ποσοστό της κατακρατηθείσας ενέργειας

	Ειλεακή πεπτικότητα			Ολική πεπτικότητα			
	Ξηρά ουσία	Λιπαρές ουσίες	Αζωτούχες ουσίες	Ξηρά ουσία	Λιπαρές ουσίες	Αζωτούχες ουσίες	Κατακρατηθείσα ενέργεια
	Επίδραση						
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>							
Χωρίς	70,6A	76,0	57,3A	75,0B	67,1A	65,4B	71,7
Ζωντανό	69,7A	80,0	59,7A	72,7A	74,2B	56,4A	72,9
Αδρανοποιημένο	76,3B	82,3	70,5B	79,5C	83,0C	67,8B	71,4
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>							
-	72,2	78,3	61,9	74,7	72,0	61,8	71,8
+	72,1	80,5	63,1	76,7	77,6	64,5	72,2
	Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>						
<b>CoN</b>	67,7a	72,3	52,5	71,9a	57,4a	63,5	71,3
<b>CoN+A</b>	73,5bc	79,7	62,1	78,2c	76,8ab	67,2	72,2
<b>ViP</b>	72,5b	79,9	61,8	74,3b	77,7ab	59,1	74,7
<b>ViP+A</b>	66,9a	80,1	57,6	71,1a	70,8b	53,7	71,1
<b>InP</b>	76,5c	82,8	71,6	78,0c	80,9cd	62,8	69,4
<b>InP+A</b>	76,2bc	81,9	69,5	80,9d	85,1d	72,7	73,3
	Στατιστικά						
<b>SEM<sup>4</sup></b>	1,17	3,25	2,83	0,51	2,34	3,03	1,47
<b>P<sub>PF</sub></b>	< 0,001	0,170	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,004	0,570
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,960	0,420	0,640	< 0,001	0,009	0,280	0,740
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	< 0,001	0,400	0,056	< 0,001	< 0,001	0,064	0,064

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής. A-C: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (A, B και C) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από  $n=4$  κλωβούς ανά επέμβαση. CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a-d: Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

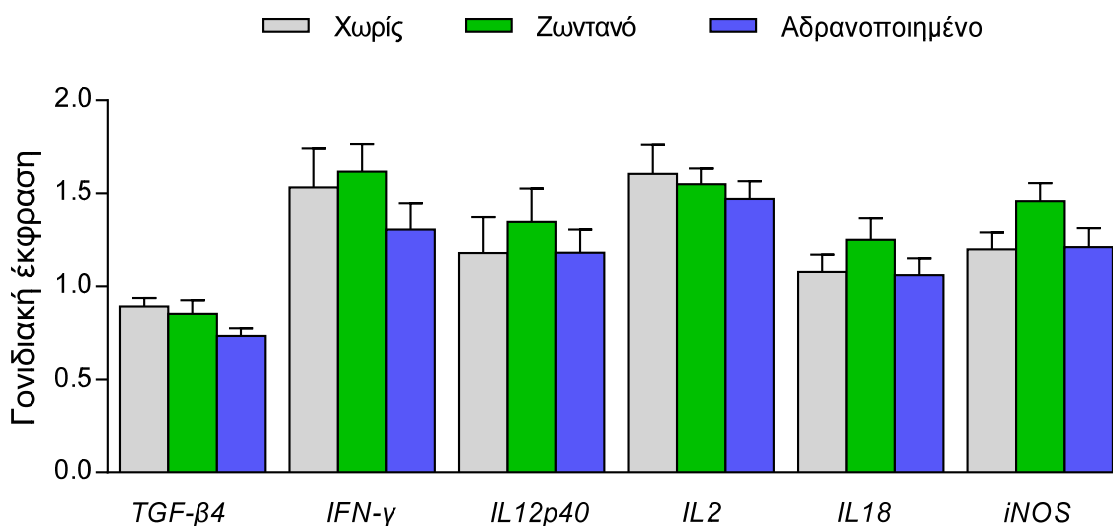
### 7.3 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα σε δευτερογενείς λεμφαδένες ορνιθίων 42 ημερών

Η έκφραση επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα προσδιορίστηκε σε δευτερογενείς λεμφαδένες ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών με τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου.

Αναλυτικότερα, στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών εκτιμήθηκε η έκφραση των *TGF-β4*, *IFN-γ*, *IL12p40*, *IL18*, *IL2* και *iNOS* ενώ στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου εκτιμήθηκε η γονιδιακή έκφραση των *TGF-β4*, *IFN-γ*, *IL10*, *IL18* και *iNOS*. Ο προσδιορισμός της *IL10* στο σπλήνα και των *IL12p40* και *IL2* στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου δεν ήταν εφικτός, διότι ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνταν για να ανιχνευτεί το σήμα φθορισμού σε εκθετική φάση αντίδρασης ήταν αρκετά υψηλός (>30).

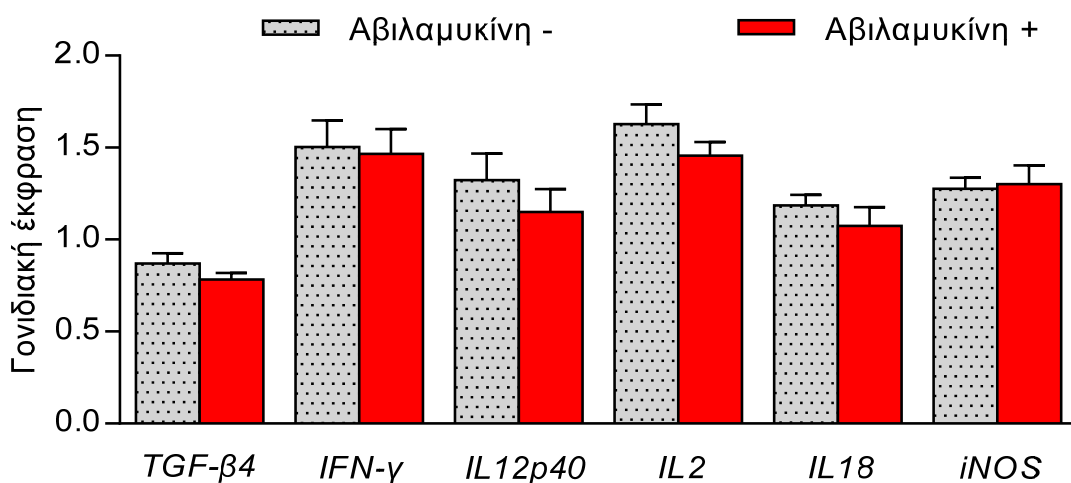
#### Σπλήνας

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των *TGF-β4*, *IFN-γ*, *IL12p40*, *IL2*, *IL18* και *iNOS* στο σπλήνα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 7.6 και 7.7.



**Διάγραμμα 7.6.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού στην γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IFN-γ*, της *IL12p40*, της *IL2*, της *IL18* και της *iNOS* στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών

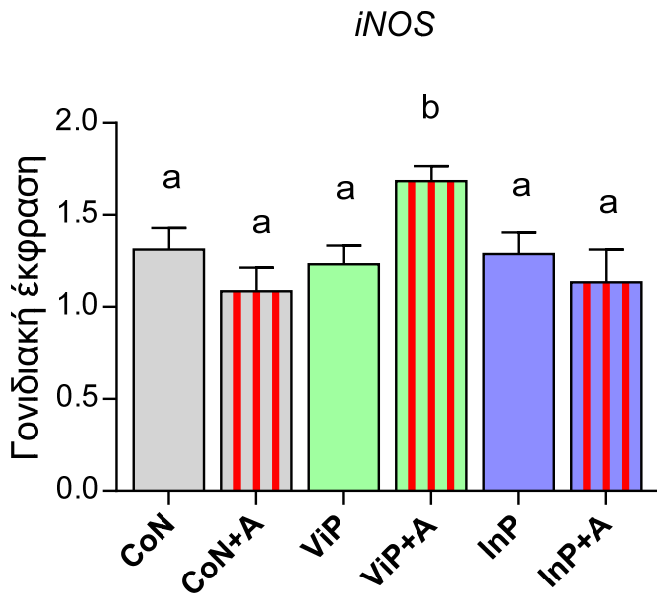
Δεν υπήρξε σημαντική επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή της αβιλαμυκίνης στη έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στο σπλήνα (Διαγράμματα 7.6 και 7.7 αντίστοιχα).



**Διάγραμμα 7.7.** Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στη γονιδιακή έκφραση του *TGF-β*, της *IFN-γ*, της *IL12p40*, της *IL2*, της *IL18* και της *iNOS* στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών

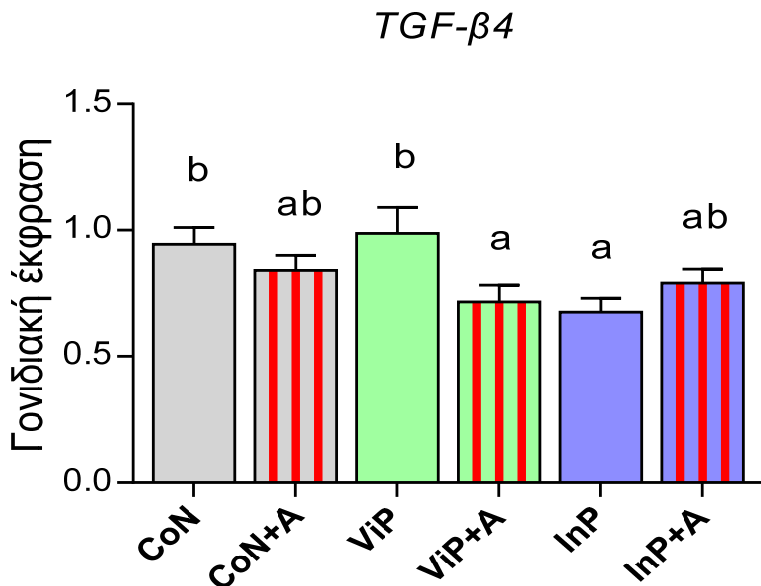
Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός των πρόσθετων υλών είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του *iNOS* και *TGF-β4* ( $P_{PF \times AV} = 0,022$  και  $P_{PF \times AV} = 0,035$  αντίστοιχα, διαγράμματα

Αναλυτικότερα, τα ορνίθια των επεμβάσεων InP και ViP+A σημείωσαν χαμηλότερες τιμές έκφρασης του *TGF-β4* σε σύγκριση με CoN and ViP.



**Διάγραμμα 7.8.** Αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση της *iNOS* στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών. Στήλες με διαφορετικά γράμματα (a,b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

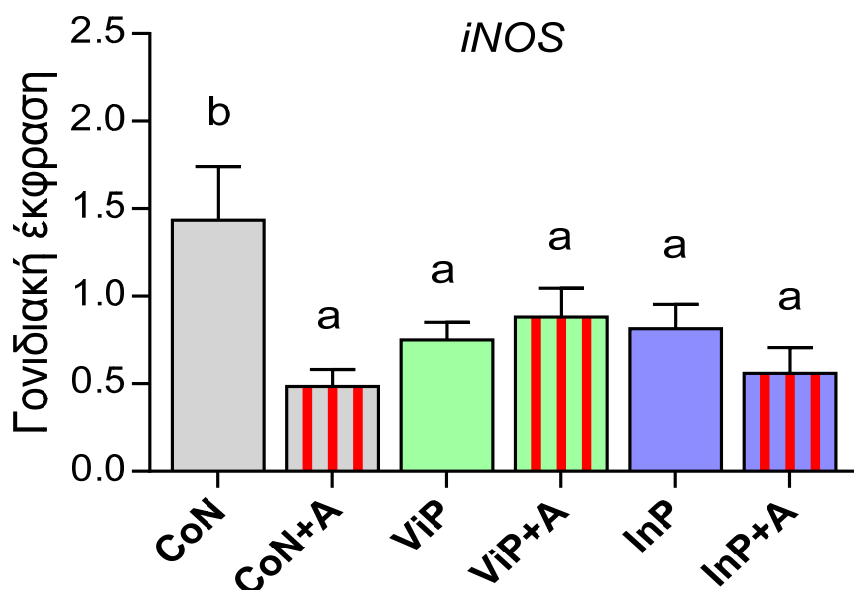
Η επέμβαση ViP+A είχε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης *iNOS* σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.



**Διάγραμμα 7.9.** Αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4* στο σπλήνα ορνιθίων 42 ημερών. Στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

### Δευτερογενείς λεμφαδένες τυφλού εντέρου

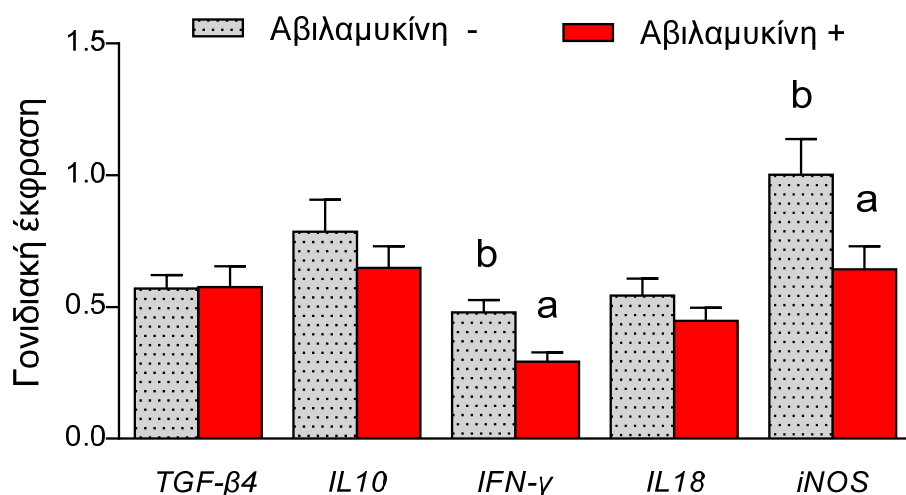
Στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση της *iNOS* ( $P_{PF \times AV} = 0,015$ ). Συγκεκριμένα, η επέμβαση CoN έλαβε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές έκφρασης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις (Διάγραμμα 7.10).



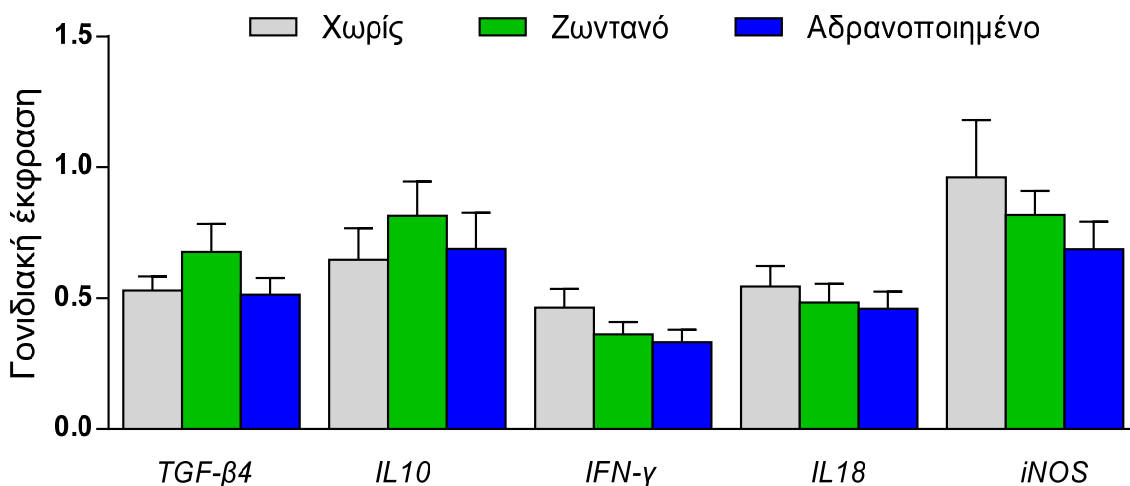
**Διάγραμμα 7.10.** Αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση της *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )

Σημαντική επίδραση της ενσωμάτωσης αβιλαμυκίνης παρουσιάστηκε στην έκφραση των *IFN-γ* και *iNOS* ( $P_{AV} = 0,002$  και  $P_{AV} = 0,018$ , αντίστοιχα), με τα ορνίθια που έλαβαν αβιλαμυκίνη να σημειώνουν σημαντικά χαμηλότερες τιμές (Διάγραμμα 7.11).

Η προσθήκη προβιοτικού δεν επηρέασε ( $P > 0,05$ ) τη γονιδιακή έκφραση των υπό μελέτη κυτταροκινών καθώς και της *iNOS* (Διάγραμμα 7.12).



**Διάγραμμα 7.11.** Επίδραση της προσθήκης αβιλαμυκίνης στη γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IL10*, της *IFN-γ*, της *IL18* και της *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφοαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών. Για το ίδιο γονίδιο στήλες με διαφορετικά γράμματα (a, b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ )



**Διάγραμμα 7.12.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού στη γονιδιακή έκφραση του *TGF-β4*, της *IL10*, της *IFN-γ*, της *IL18* και της *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφοαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών

#### 7.4 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο και στα τυφλά έντερα

##### Ειλεακό περιεχόμενο

Σημαντική επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ( $P_{PF} = 0,021$ ) παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση του πληθυσμού των *Bacteroides* στο περιεχόμενο του ειλεού (Πίνακας 7.24). Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση του πληθυσμού των *Bacteroides* ήταν υψηλότερη στα ορνίθια που κατανάλωσαν ζωντανό προβιοτικό σε σύγκριση με τα ορνίθια που κατανάλωσαν αδρανοποιημένο, ενώ στα ορνίθια που δεν κατανάλωσαν προβιοτικό έλαβε ενδιάμεσες τιμές. Επιπλέον, η προσθήκη αβιλαμυκίνης μείωσε τη συγκέντρωση του πληθυσμού των *Lactobacillus spp.* ( $P_{AV} < 0,001$ ) στο ειλεακό περιεχόμενο. Σε αντίθεση, καμία σημαντική αλληλεπίδραση ( $P > 0,05$ ) δεν παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση, των ολικών βακτηρίων, του γένους *Bifidobacterium* και των πληθυσμών *C. coccoides* subgroup, *C. leptum* subgroup και *C. perfringens* subgroup.

##### Επιθήλιο του ειλεακού βλεννογόνου

Η συγκέντρωση των ολικών βακτηριακών κυττάρων που αποικίζουν το επιθήλιο του ειλεού παρουσίασε σημαντική μεταβολή στα ορνίθια που κατανάλωσαν το συνδυασμό των πρόσθετων υλών ( $P_{PF \times AV} = 0,028$  ; Πίνακας 7.25). Πιο συγκεκριμένα, η επέμβαση ViP είχε σημαντική υψηλότερη συγκέντρωση του γένους *Lactobacillus spp.* συγκριτικά με την επέμβαση InP, ενώ οι υπόλοιπες επεμβάσεις έλαβαν ενδιάμεσες τιμές. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του πληθυσμού *C. coccoides* subgroup ( $P > 0,05$ ).

##### Περιεχόμενο των τυφλών εντέρων

Η συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων, του είδους *Escherichia coli* του γένους *Bifidobacterium* και των πληθυσμών *Bacteroides*, *C. coccoides* subgroup και *C. leptum* subgroup δεν επηρεάστηκαν ( $P > 0,05$ ) από το τύπο προσθήκης του προβιοτικού ή / και από την αβιλαμυκίνη (Πίνακας 7.26). Αντίθετα, η κατανάλωση αβιλαμυκίνης επέφερε σημαντική μείωση ( $P_{AV} = 0,018$ ) στην συγκέντρωση του πληθυσμού *C. perfringens* subgroup στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων. Ο συνδυασμός των πρόσθετων υλών είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του γένους *Lactobacillus spp.* ( $P_{PF \times AV} = 0,005$ ). Πιο συγκεκριμένα, η επέμβαση CoN+A έλαβε χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επιπλέον, στον ίδιο βακτηριακό πληθυσμό υπήρχε σημαντική κύρια επίδραση του τύπου

προσθήκης του προβιοτικού ( $P_{PF} = 0,038$ ). Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση του γένους *Lactobacillus spp.* εμφάνισε υψηλότερες τιμές στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου ορνιθίων που κατανάλωσαν ζωντανό προβιοτικό συγκριτικά εκείνων που δεν κατανάλωσαν προβιοτικό.

#### **Επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων**

Όσον αφορά τα επίπεδα των βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή ( $P > 0,05$ ) από τον τύπο προσθήκης του προβιοτικού ή / και για την αβιλαμυκίνη (Πίνακας 7.27).



**Πίνακας 7.24.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στο ειλεακό περιεχομένου (log βακτηριακών κυττάρων/g υγρού περιεχομένου)

	<b>Ολικά βακτήρια</b>	<b><i>Bacteroides</i> spp.</b>	<b><i>Lactobacillus</i> spp.</b>	<b><i>Escherichia</i> <i>coli</i></b>	<b><i>C. perfringens</i> subgroup</b>	<b><i>C. coccoides</i> subgroup</b>	<b><i>C. leptum</i> subgroup</b>
Επίδραση							
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>							
Χωρίς	8,39	4,51AB	7,24	5,43	6,75	7,43	5,39
Ζωντανό	8,63	4,87B	7,42	5,38	6,63	7,50	5,63
Αδρανοποιημένο	8,40	4,29A	7,41	5,40	6,41	7,50	5,44
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>							
-	8,56	4,63	7,71	5,22	6,69	7,52	5,50
+	8,39	4,48	7,00	5,58	6,51	7,43	5,47
Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>							
<b>CoN</b>	8,51	4,64	7,63	5,31	6,90	7,54	5,43
<b>CoN+A</b>	8,26	4,38	6,85	5,55	6,60	7,31	5,36
<b>ViP</b>	8,68	5,09	7,76	5,45	7,00	7,52	5,66
<b>ViP+A</b>	8,58	4,64	7,07	5,30	6,27	7,47	5,60
<b>InP</b>	8,48	4,15	7,74	4,89	6,17	7,49	5,42
<b>InP+A</b>	8,32	4,43	7,01	5,90	6,65	7,51	5,47
Στατιστικά							
<b>SEM<sup>4</sup></b>	0,125	0,202	0,213	0,374	0,338	0,163	0,168
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,104	0,021	0,694	0,990	0,608	0,885	0,338
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,103	0,380	<0,001	0,238	0,517	0,534	0,829
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	0,841	0,173	0,981	0,297	0,205	0,723	0,927

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής. Α,Β: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05).

<sup>2</sup> Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup> Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n=10 ορνίθια ανά επέμβαση, CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup> SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 7.25.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του ειλεακού βλεννογόνου (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)

	Ολικά βακτήρια	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>C. coccoides</i> subgroup
	Επίδραση		
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>			
Χωρίς	7,27	5,53	6,01
Ζωντανό	7,25	5,49	6,04
Αδρανοποιημένο	7,19	5,38	5,92
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>			
-	7,28	5,62	6,03
+	7,20	5,31	5,95
	Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>		
<b>CoN</b>	7,34ab	5,79	6,11
<b>CoN+A</b>	7,20ab	5,28	5,91
<b>ViP</b>	7,42b	5,81	6,12
<b>ViP+A</b>	7,09ab	5,17	5,95
<b>InP</b>	7,07a	5,28	5,84
<b>InP+A</b>	7,31ab	5,49	6,00
	Στατιστικά		
<b>SEM<sup>4</sup></b>	0,104	0,223	0,116
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,738	0,787	0,583
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,384	0,095	0,443
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	0,028	0,132	0,243

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής.

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n= 10 ορνίθια ανά επέμβαση, CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a,b: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 7.26.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών του περιεχομένου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων/g υγρού περιεχομένου)

	Ολικά βακτήρια	<i>Bacteroides</i> <i>spp.</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>C. perfringens</i> subgroup	<i>C. coccoides</i> subgroup	<i>C. leptum</i> subgroup
Επίδραση								
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>								
Χωρίς	10,17	9,50	7,53A	5,81	7,70	7,80	9,57	9,36
Ζωντανό	10,16	9,53	7,84B	5,89	7,98	7,71	9,57	9,44
Αδρανοποιημένο	10,19	9,59	7,72AB	5,87	7,94	7,65	9,54	9,39
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>								
-	10,18	9,52	7,76	5,91	7,88	7,84	9,57	7,84
+	10,17	9,55	7,63	5,81	7,88	7,60	9,55	7,60
Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>								
<b>CoN</b>	10,17	9,47	7,79b	6,03	7,69	8,06	9,56	9,27
<b>CoN+A</b>	10,18	9,54	7,26a	5,58	7,72	7,54	9,57	9,45
<b>ViP</b>	10,15	9,55	7,70b	5,68	7,86	7,72	9,58	9,50
<b>ViP+A</b>	10,18	9,51	7,98b	6,10	8,11	7,69	9,55	9,39
<b>InP</b>	10,22	9,56	7,80b	6,01	8,09	7,72	9,56	9,39
<b>InP+A</b>	10,15	9,61	7,64b	5,73	7,80	7,58	9,53	9,38
Στατιστικά								
<b>SEM<sup>4</sup></b>	0,067	0,078	0,118	0,195	0,166	0,116	0,053	0,076
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,935	0,553	0,038	0,901	0,201	0,412	0,880	0,544
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,836	0,668	0,168	0,534	0,987	0,018	0,729	0,731
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	0,704	0,750	0,005	0,068	0,279	0,103	0,893	0,174

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής. A, B: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (A και B) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από  $n=10$  ορνίθια ανά επέμβαση, CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a, b: Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (a και b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 7.27.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στη συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με το επιθήλιο του βλεννογόνου των τυφλών εντέρων (log βακτηριακών κυττάρων /g κυτταρικού συσσωματώματος)

	<b>Ολικά βακτήρια</b>	<b><i>Bacteroides spp.</i></b>	<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>	<b><i>C. coccoides</i> subgroup</b>	<b><i>C. leptum</i> subgroup</b>
	Επίδραση				
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>					
Χωρίς	8,60	7,69	5,92	7,87	8,22
Ζωντανό	8,75	7,91	6,17	7,94	8,39
Αδρανοποιημένο	8,68	7,76	6,08	7,88	8,32
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>					
-	8,67	7,75	6,13	7,93	8,32
+	8,68	7,82	5,98	7,87	8,30
	Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>				
<b>CoN</b>	8,62	7,61	6,15	7,84	8,22
<b>CoN+A</b>	8,59	7,77	5,70	7,91	8,22
<b>ViP</b>	8,80	8,01	6,25	8,10	8,49
<b>ViP+A</b>	8,70	7,80	6,08	7,78	8,31
<b>InP</b>	8,60	7,63	5,98	7,84	8,27
<b>InP+A</b>	8,76	7,89	6,17	7,91	8,36
	Στατιστικά				
<b>SEM<sup>4</sup></b>	0,128	0,162	0,198	0,137	0,124
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,510	0,404	0,469	0,877	0,350
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,935	0,590	0,373	0,610	0,752
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	0,598	0,322	0,280	0,268	0,544

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής.

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από n=10 ορνίθια ανά επέμβαση, CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

## 7.5 Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού

Για τη μελέτη της λειτουργίας του εντερικού φραγμού προσδιορίστηκε η γονιδιακή έκφραση των *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4* στον ειλέο και στα τυφλά έντερα. Τα αποτελέσματα της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων παρουσιάζονται στους πίνακες 6.28. και 6.29.

### Ειλέος

Σημαντική μείωση ( $P_{PF} = 0,021$ ) στα επίπεδα έκφρασης του *NFKB1* σημειώθηκε στα ορνίθια που κατανάλωσαν ζωντανό προβιοτικό σε σχέση με αυτά που δεν κατανάλωσαν προβιοτικό. Σε αντίθεση η προσθήκη ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού δεν επηρέασε σημαντικά ( $P > 0,05$ ) την έκφραση των *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *OCLN*, *TLR2B* και *TLR4* (Πίνακας 7.28).

Τα επίπεδα έκφρασης του *TLR4* εμφάνισαν σημαντική μείωση ( $P_{AV} = 0,006$ ) από την ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο. Αντιθέτως, η έκφραση των υπόλοιπων υπό μελέτη γονιδίων δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή ( $P > 0,05$ ) από την προσθήκη αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο.

Ο συνδυασμός των πρόσθετων υλών είχε σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση της *CLDN1* ( $P_{PF \times AV} = 0,018$ ). Αναλυτικότερα, η επέμβαση CoN είχε χαμηλότερη γονιδιακή έκφραση σε σύγκριση με την επέμβαση InP+A.

### Τυφλά έντερα

Δεν σημειώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση όλων των υπό εξέταση γονιδίων στα τυφλά έντερα (Πίνακας 6.29). Τα ορνίθια που κατανάλωσαν ζωντανό προβιοτικό είχαν χαμηλότερη έκφραση των *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4* ( $P_{PF} = 0,014$ ,  $P_{PF} = 0,002$ ,  $P_{PF} = 0,026$  και  $P_{PF} = 0,011$  αντίστοιχα) στο τυφλό έντερο σε σύγκριση με αυτά που έλαβαν αδρανοποιημένο προβιοτικό ή δεν έλαβαν προβιοτικό. Σε αντίθεση, τα επίπεδα έκφρασης των *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1* και *CLDN5* δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από την χορήγηση ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού. Η ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης μείωσε σημαντικά ( $P_{AV} = 0,026$ ) την έκφραση της *CLDN5*, ενώ δεν επηρέασε την γονιδιακή έκφραση των *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4*. Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντερικού φραγμού.

**Πίνακας 7.28.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού του ειλεού

	<i>ZO1</i>	<i>ZO2</i>	<i>CLDN1</i>	<i>CLDN5</i>	<i>OCLN</i>	<i>NFKB1</i>	<i>TLR2B</i>	<i>TLR4</i>	
	Επίδραση								
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>									
Χωρίς	1,46	1,34	1,42	1,24	1,04	1,23B	1,60	1,45	
Ζωντανό	1,00	1,12	1,50	1,14	0,99	0,81A	0,96	1,19	
Αδρανοποιημένο	1,13	1,06	0,93	1,30	0,31	1,02AB	1,09	1,28	
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>									
-	1,31	1,24	1,42	1,35	1,04	1,06	1,23	1,68	
+	1,09	1,11	1,14	1,11	1,18	0,98	1,20	0,92	
	Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>								
<b>CoN</b>	1,67	1,50	1,97b	1,37	1,10	1,35	1,66	1,97	
<b>CoN+A</b>	1,25	1,18	0,87ab	1,12	0,97	1,11	1,54	0,92	
<b>ViP</b>	0,91	1,13	1,17ab	1,13	0,74	0,76	1,04	1,27	
<b>ViP+A</b>	1,09	1,12	1,83ab	1,15	1,23	0,85	0,87	1,10	
<b>InP</b>	1,34	1,10	1,13ab	1,56	1,28	1,06	0,99	1,81	
<b>InP+A</b>	0,92	1,02	0,73a	1,05	1,34	0,97	1,20	0,74	
	Στατιστικά								
<b>SEM<sup>4</sup></b>	0,245	0,195	0,262	0,261	0,196	0,164	0,226	0,298	
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,194	0,133	0,065	0,896	0,186	0,021	0,175	0,374	
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,334	0,499	0,118	0,367	0,367	0,896	0,228	0,006	
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	0,537	0,618	0,018	0,744	0,163	0,395	0,568	0,626	

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής. A, B: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (A και B) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από  $n=10$  ορνίθια ανά επέμβαση, CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής. a, b: Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (a και b) διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

**Πίνακας 7.29.** Επίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού ή / και της αβιλαμυκίνης στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών της στενής σύνδεσης, του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β και των υποδοχέων toll-like 2 και 4 που σχετίζονται με τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού των τυφλών εντέρων

	<i>ZO1</i>	<i>ZO2</i>	<i>CLDN1</i>	<i>CLDN5</i>	<i>OCLN</i>	<i>NFKB1</i>	<i>TLR2B</i>	<i>TLR4</i>
Επίδραση								
<b>Τύπος προσθήκης προβιοτικού<sup>1</sup></b>								
Χωρίς	1,30	1,16	1,55	1,46	1,66B	1,38B	1,84B	1,64B
Ζωντανό	0,99	0,98	0,94	1,03	0,91A	0,87A	1,07A	0,77A
Αδρανοποιημένο	1,52	1,22	1,39	1,46	1,59B	1,59B	1,80B	1,52B
<b>Αβιλαμυκίνη<sup>2</sup></b>								
-	1,06	1,06	1,21	1,02	1,36	1,20	1,67	1,12
+	1,48	1,18	1,38	1,61	1,41	1,36	1,48	1,51
Αλληλεπίδραση (Επεμβάσεις) <sup>3</sup>								
<b>CoN</b>	1,12	1,12	1,40	0,76	1,52	1,12	1,73	1,20
<b>CoN+A</b>	1,47	1,21	1,71	2,16	1,80	1,64	1,95	2,09
<b>ViP</b>	0,81	0,90	0,97	1,09	0,91	0,94	1,21	0,77
<b>ViP+A</b>	1,16	1,06	0,90	0,97	0,91	0,81	0,94	0,76
<b>InP</b>	1,25	1,16	1,25	1,20	1,66	1,54	2,06	1,39
<b>InP+A</b>	1,79	1,27	1,52	1,71	1,52	1,64	1,54	1,66
Στατιστικά								
<b>SEM<sup>4</sup></b>	0,281	0,194	0,231	0,318	0,309	0,208	0,308	0,303
<b>P<sub>PF</sub></b>	0,170	0,453	0,058	0,310	0,014	0,002	0,026	0,011
<b>P<sub>AV</sub></b>	0,075	0,459	0,620	0,026	0,892	0,607	0,457	0,121
<b>P<sub>PF×AV</sub></b>	0,926	0,987	0,918	0,065	0,438	0,268	0,487	0,316

<sup>1</sup>Χωρίς: ΒΣ χωρίς προσθήκη προβιοτικού; Ζωντανό: 1g προβιοτικού / kg τροφής; Αδρανοποιημένο: 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής. A, B: Μέσοι όροι μέσα στην ίδια στήλη με διαφορετικά γράμματα (A και B) διαφέρουν σημαντικά (P ≤ 0,05).

<sup>2</sup>Αβιλαμυκίνη - : χωρίς προσθήκη αβιλαμυκίνης; Αβιλαμυκίνη + : προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>3</sup>Μέσοι όροι αλληλεπίδρασης (Επεμβάσεις) από ν=10 ορνίθια ανά επέμβαση, CoN:ΒΣ χωρίς καμία προσθήκη; CoN+A: προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; ViP: 1g προβιοτικού / kg τροφής; ViP+A: 1g προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής; InP: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής and InP+A: προσθήκη 1g θερμικά αδρανοποιημένου προβιοτικού / kg τροφής + 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής.

<sup>4</sup>SEM: Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

## Z. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η μικροχλωρίδα που αποικίζει τον γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών θεωρείται ένα μεταβολικά ενεργό τμήμα του σώματος (O'Hara and Shanahan 2006). Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι βακτηριακοί πληθυσμοί αποτελούν ένα ουσιαστικό στοιχείο για την υγεία, με διατροφική και προστατευτική επίδραση επί της εντερικής δομής και ομοιοστασίας. Η διαμόρφωση / τροποποίηση της μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής μέσω διατροφικών χειρισμών με σκοπό τη βελτίωση παραμέτρων του εντερικού οικοσυστήματος που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την ανοσία, τη φυσιολογία απασχολεί έντονα τον ερευνητικό κόσμο τα τελευταία χρόνια.

### 8. Σχολιασμός της 1<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης - Οξιμιστής

Η χορήγηση οξιμιστή σε συγκέντρωση 0,1 % (1g / kg τροφής) βελτίωσε τα παραγωγικά χαρακτηριστικά στην φάση πάχυνσης και κατά τη διάρκεια όλου του πειράματος. Θετικά αποτελέσματα από την κατανάλωση οργανικών οξέων έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες. Αναλυτικότερα, η ενσωμάτωση στο σιτηρέσιο μυρμηκικού ή προπιονικού οξέος ή συνδυασμού τους σε συγκέντρωση 0,1 %, 0,2 % και 0,3 % αντίστοιχα, βελτίωσε το σωματικό βάρος, την αύξηση του σωματικού βάρους και τον συντελεστή εκμετάλλευσης σε ορνίθια 42 ημερών (Galib Al-Kassi and Aqeel Mohssen 2009). Η κατανάλωση οξικού οξέος, κιτρικού οξέος και γαλακτικού οξέος σε συγκεντρώσεις 1,5 ή 3 % είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του σωματικού βάρους στην τελική φάση και της συνολικής αύξησης του σωματικού βάρους και του συνολικού ΣΕ (Abdel-Fattah *et al.* 2008). Η κατανάλωση κιτρικού οξέος σε συγκέντρωση 0,5 % επέδρασε θετικά στο σωματικό βάρος, στην αύξηση του σωματικού βάρους και στο συντελεστή εκμετάλλευσης ορνιθίων 35 ημερών (Chowdhury *et al.* 2009). Ακόμα, η προσθήκη ενός μίγματος οργανικών οξέων (γαλακτικού, φουμαρικού, κιτρικού και μυρμηκικού οξέος) σε συγκέντρωση 0,5 % στο σιτηρέσιο ορνιθίων οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα με τα παραπάνω (Kim *et al.* 2009).

Υπάρχουν ωστόσο και εργασίες στις οποίες αναφέρεται ότι η επίδραση της προσθήκης μεμονωμένων οργανικών οξέων ή μιγμάτων περιορίζεται στην βελτίωση της αύξησης του ζώντος βάρους, χωρίς να βελτιώνεται ο συντελεστής εκμετάλλευσης (Bortoluzzi *et al.* 2017), ενώ σε άλλες αναφέρεται ότι η προσθήκη δεν είχε επίδραση (Gunal *et al.* 2006, Houshmand *et al.* 2012). Παράλληλα έχουν αναφερθεί και μελέτες στις οποίες η ενσωμάτωση οργανικών



οξέων στο σιτηρέσιο επέφερε αντίθετα από τα επιθυμητά αποτελέσματα και οδήγησε σε μείωση της ανάπτυξης (Biggs and Parsons 2008, Jozefiak *et al.* 2010). Αναλυτικότερα, σε εργασία των Biggs and Parsons (2008) η προσθήκη 2 % ή 4 % ή 6 %, γλυκονικού οξέος σε ή 4 % κιτρικού οξέος στο σιτηρέσιο επέφερε μείωση στο σωματικό βάρος, χωρίς να επηρεάζεται η κατανάλωση τροφής, σε σύγκριση με το μάρτυρα σε ορνίθια ηλικίας 21 ημερών. Μείωση στην συνολική αύξηση του ζώντος βάρους (1 - 42 ημέρες) σημειώθηκε από την προσθήκη 0,2 % (2g/kg τροφής) βενζοϊκού οξέος σε σχέση με το μάρτυρα (Jozefiak *et al.* 2010)

Προς το παρόν δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα ο μηχανισμός δράσης των οξινιστών. Ωστόσο όπως αναφέρεται από τους Papatsiros *et al.* (2012) η χημική δομή, η pKa, τα χημικά χαρακτηριστικά (σε εστεροποιημένη μορφή ή σε μη εστεροποιημένη, οξύ ή άλας, επικαλυμμένο ή μη επικαλυμμένο), το μοριακό βάρος του οξέος, η συγκέντρωση του οξέος στην τροφή, η ρυθμιστική ικανότητα της τροφής, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του οξέος έναντι μικροοργανισμών και η υγιεινή του περιβάλλοντος ανατροφής είναι μερικοί από τους παράγοντες που φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των παραπάνω αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά, ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η συγκέντρωση του οξέος στην τροφή. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των Giannenas *et al.* (2014) οι οποίοι παρατήρησαν ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης του βενζοϊκού οξέος από 0,3 % σε 1% (από 300 σε 1000 mg/kg) στη τροφή το σωματικό βάρος ορνιθίων 42 ημερών μειώθηκε από 2348 kg σε 2211 kg. Επίσης, μείωση στην συνολική αύξηση του ζώντος βάρους κατά 12 % (2318 σε 2039) σημειώθηκε από την προσθήκη βενζοϊκού οξέος σε συγκέντρωση 0,2 % σε σύγκριση με τη χαμηλότερα συγκέντρωση που ήταν 0,1 %.

Παρόλο που εντός Ε.Ε οι ΑΑΠ έχουν απαγορευτεί στην παραγωγή αγροτικών ζώων, εντούτοις οι ΑΑΠ χρησιμοποιούνται παγκοσμίως σε ένα μεγάλο αριθμό χωρών (Laxminarayan *et al.* 2015, Marshall and Levy 2011). Η αβιλαμκίνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα ανήκει στους ΑΑΠ και κατατάσσεται στις ορθοσομκίνες (Boll *et al.* 2006) και έχει χρησιμοποιηθεί σε εργασίες ως θετικός μάρτυρας για την αξιολόγηση προβιοτικών (Mountzouris *et al.* 2010, Fajardo *et al.* 2012), προβιοτικών βιοενεργών ουσιών (Morales-López *et al.* 2010, Kim *et al.* 2011), αιθερίων ελαίων (Mountzouris *et al.* 2011, Mathlouthi *et al.* 2012) και οργανικών οξέων / οξινιστών (Motoki *et al.* 2011). Σε αυτό το πλαίσιο, η αβιλαμκίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας έτσι ώστε να εκτιμηθεί η αποδοτικότητα του οξινιστή. Επίσης, η εκτίμηση της ταυτόχρονης χορήγησης οξινιστή μαζί με αβιλαμκίνη θεωρήθηκε σημαντική για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης του οξινιστή.

Η διαιτητική χορήγηση του οξιμιστή είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ολικής πεπτικότητας της ΞΟ, ΟΟ του σιτηρεσίου και επίσης βελτίωσε και την κατακρατηθείσα ενέργεια του σιτηρεσίου. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Ao *et al.* (2009) οι οποίοι παρατήρησαν καλύτερη πεπτικότητα, της ΞΟ, των ΑΟ, των ινωδών ουσιών αδιάλυτων σε ουδέτερο διάλυμα, του σιτηρεσίου μετά από προσθήκη κιτρικού οξέος σε ορνίθια 21<sup>ος</sup> ημερών. Επιπρόσθετα, η ενσωμάτωση φουμαρικού οξέος, σε συγκέντρωση 0,5 και 1 % της τροφής ενίσχυσε την φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια σε σύγκριση με το σιτηρέσιο που δεν υπήρχε προσθήκη (Runho *et al.* 1997).

Η βελτίωση της πεπτικότητας του σιτηρεσίου μπορεί να συνδεθεί με την αύξηση, της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων ή / και της ικανότητας του εντερικού σωλήνα να απορροφά θρεπτικά συστατικά. Όμως, σύμφωνα με αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας (Palamidí *et al.* 2016a) ο οξιμιστής δεν αύξησε την ενεργότητα των πεπτικών ενζύμων κατά μήκος του εντερικού σωλήνα. Όσον αφορά την ικανότητα του εντέρου να απορροφά θρεπτικά συστατικά, έχει προταθεί ότι η κατανάλωση οξιμιστών έχει άμεση επίδραση στην εντερική δομή, το οποίο μπορεί να διευκολύνει την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (Sugiharto 2016). Η δυνατότητα των οξιμιστών / οργανικών οξέων να τροποποιούν τη δομή του εντέρου σε κυτταρικό επίπεδο έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες (Senkoğlu *et al.* 2007, Adil *et al.* 2010), κάτι που συνάδει με το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης.

Η αύξηση της πυκνότητας των ανοσοκυττάρων σε λεμφικά όργανα, των επιπέδων σφαιρίνης στον ορό του αίματος και του βάρους ανοσιακών οργάνων (Abdel-Fattah *et al.* 2008, Chowdhury *et al.* 2009, Haque *et al.* 2010, Ghazalah *et al.* 2011), είναι κάποιες από τις ενδείξεις ότι οι οξιμιστές επιδρούν σε παραμέτρους του ανοσιακού συστήματος. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός της θετικής επίπτωσης είναι ακόμα άγνωστος. Στην παρούσα εργασία, η γονιδιακή έκφραση κυτταροκινών και της *iNOS* σε δευτερογενή λεμφικά όργανα μελετήθηκαν ως δείκτες της ανοσιακής λειτουργίας. Η προσθήκη οξιμιστή δεν επηρέασε τη σχετική έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν στον σπλήνα. Είναι πιθανό η ενσωμάτωση οργανικών οξέων στο σιτηρέσιο όπως στην περίπτωση της προσθήκης εκχυλισμάτων από το φρούτο *Prunus* (Jang *et al.* 2013) να αυξάνει την γονιδιακή έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο σπλήνα. Παρόλα αυτά, η κατανάλωση εκχυλίσματος *Prunus* δεν επηρέασε την έκφραση του γονιδίου *iNOS* στον σπλήνα το οποίο είναι σε συμφωνία με αυτή την εργασία, βεβαία όχι άμεσα συγκρίσιμο. Η προσθήκη αβιλαμυκίνης μείωσε τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των *IFN-γ*, *IL18* και *iNOS* στο σπλήνα. Η *IFN-γ* θεωρείται μια κρίσιμη κυτταροκίνη για την έκβαση της ανοσιακής απάντησης έναντι παθογόνων. Η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της *IFN-γ* έχει

συνδεθεί με την ασθένεια Marek (Kaiser *et al.* 2003) με προσβολή από *Eimeria* (Hong *et al.* 2006) και *S. Enteritidis* (Crhanova *et al.* 2011). Η IL18 χαρακτηρίστηκε αρχικά ως παράγοντας ο οποίος διεγείρει την παραγωγή της IFN- $\gamma$ . Σήμερα είναι γνωστό ότι είναι μία πλειοτροπική κυτταροκίνη η οποία μεσολαβεί στην ανοσιακή απόκριση των Th1 και Th2 λεμφοκυττάρων (Bamias *et al.* 2012). Η iNOS επάγεται από ποικίλους παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με τη φλεγμονή (Brujeni *et al.* 2008). Συνεπώς η μείωση της σχετικής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων υποδηλώνει την αντιφλεγμονώδη επίδραση της αβιλαμυκίνης, η οποία μπορεί να είναι είτε άμεση, είτε μεσολαβούμενη από τα βακτηριακά κύτταρα σε επίπεδο εντέρου (Niewold 2007, Kroismayr *et al.* 2008, Bielecka *et al.* 2010).

Στους δευτερογενείς λεμφαδένες, εκτός από την σημαντική επίδραση του οξινιστή και της αβιλαμυκίνης στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων IL10 και IL18 (μόνο ο οξινιστής), σημαντική αλληλεπίδραση σημειώθηκε στην έκφραση των *IL10*, *IL18* και *IL22*. Αναλυτικότερα, η επέμβαση ACAV αύξησε την έκφραση της *IL10* και *IL18* σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις και της *IL22* σε σύγκριση με την επέμβαση AV. Η κυτταροκίνη IL10 είναι μία αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία συμβάλει στη διατήρηση της εντερικής ανοσιακής ομοιοστασίας και συνεπώς η αύξηση της έκφρασης της θα μπορούσε να θεωρηθεί ευεργετική για την εντερική υγεία. Για παράδειγμα, ένας από τους παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην παθολογική κατάσταση του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου στους ανθρώπους είναι η μειωμένη λειτουργία της IL10 σηματοδότησης (Paul *et al.* 2012). Διαδοχικά, η IL22 ανήκει στην οικογένεια των IL10 κυτταροκινών. Η IL22 δεν έχει ρόλο επικοινωνίας ανάμεσα στα ανοσιακά κύτταρα αλλά αυξάνει την φυσική ανοσιακή απόκριση στα επιθηλιακά κύτταρα, προστατεύει τους ιστούς από φθορά και ενισχύει την αναγέννηση (Kim *et al.* 2012). Επιπλέον, η IL18 είναι κρίσιμη για την διατήρηση της εντερικής ομοιοστασίας και το φραγμό έναντι της βακτηριακής μετατόπισης (Siegmond 2010). Βάσει των βελτιωμένων παραγωγικών χαρακτηριστικών της επέμβασης ACAV, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των IL10, IL18 και IL22 οφείλεται στην καλύτερη διαχείριση του περιβάλλοντος των τυφλών εντέρων στο οποίο η συγκέντρωση και η μεταβολική της μικροχλωρίδας είναι αυξημένη.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η μικροχλωρίδα συμβάλλει στην εντερική λειτουργία και επομένως έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και την υγεία των ορνιθίων. Η συντριπτική πλειοψηφία των μικροοργανισμών του εντέρου αποικίζει το τυφλό έντερο, τα οποία ανήκουν σε αναερόβιους βακτηριακούς πληθυσμούς (Mohd Shaufi *et al.* 2015, Oakley and Kogut 2016).

Σε αυτή τη μελέτη, εφαρμόστηκε η PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της επίδρασης της διαιτητικής προσθήκης ενός οξινιστή και / ή αβιλαμυκίνης, σε επιλεγμένους βακτηριακούς πληθυσμούς του ειλεακού ή τυφλικού περιεχομένου και του βλεννογόνου. Συγκεκριμένα, στο επίπεδο του ειλεού, η χορήγηση οξινιστή σε συνδυασμό με την αβιλαμυκίνη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ολικών βακτηρίων που σχετίζονται με τον βλεννογόνο. Η χρήση της αβιλαμυκίνης συνδέθηκε με μείωση της συγκέντρωσης του βακτηριακού πληθυσμού *C. perfringens* στο περιεχόμενο του ειλεού. Όπως είναι γνωστό η αβιλαμυκίνη εμφανίζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων (La-ongkhum *et al.* 2011) όπως το *C. perfringens* (Knarreborg *et al.* 2002, Immerseel *et al.* 2004). Γενικά, οι οξινιστές είναι γνωστό ότι έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Van Immerseel *et al.* 2006, Mani-López *et al.* 2012) που μπορεί να επηρεάσουν τη συγκέντρωση βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ ή που ανήκουν στο είδος *E. coli* στον ειλέο (Pirgozliev *et al.* 2008, Nava *et al.* 2009, Hashemi *et al.* 2012, Sun *et al.* 2013). Συνεπώς προκύπτει ότι η μείωση του πληθυσμού των συγκεκριμένων βακτηρίων θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της άμεσης δράσης της αβιλαμυκίνης σε αυτά.

Στο τυφλό έντερο, η προσθήκη οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης δεν είχε επίδραση στους υπό εξέταση βακτηριακούς πληθυσμούς που σχετίζονται με το βλεννογόνο. Παρόλα αυτά, οι βακτηριακοί πληθυσμοί *C. coccooides* και *C. leptum* αυξήθηκαν με την προσθήκη οξινιστή. Η επίδραση οξινιστή σε μέλη της τυφλικής μικροχλωρίδας (π.χ. ολικά βακτήρια ή Σαλμονέλα) έχει αναφερθεί σε παλαιότερες έρευνες (Fernandez-Rubio *et al.* 2009, Hamed and Hassan 2013). Η αύξηση των πληθυσμών *C. coccooides* subgroup και *C. leptum* subgroup, επίσης γνωστοί ως ομάδες *Clostridium XIVa* και *Clostridium IV* αντίστοιχα, θα μπορούσε να θεωρηθεί σημαντική και επωφελής για την υγεία του εντέρου, διότι εκτός του ότι είναι κυρίαρχα στο περιβάλλον του εντερικού χυμού (Gong *et al.* 2007), ανήκει σε αυτά ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ το οποίο είναι σημαντικό για την εντερική ομοιοστασία (Van Immerseel *et al.* 2010, Lopetuso *et al.* 2013).

Η ενσωμάτωση του οξινιστή οδήγησε στη μείωση της έκφρασης, γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της TJ στον ειλέο. Μειωμένη έκφραση αυτών των γονιδίων έχει συνδεθεί με πρόκληση της ανοσιακής απόκρισης από λιποπολυσακχαρίτη ή με παθολογικές καταστάσεις (Cox *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2012, Wang *et al.* 2014, Chen *et al.* 2015, Lee *et al.* 2017) οι οποίες χαρακτηρίζονται από σοβαρή ειλεακή φλεγμονή (Chen *et al.* 2015). Γενικά, το έντερο είναι ένα όργανο το οποίο προκειμένου να αντισταθμίσει μια σειρά συνεχών προκλήσεων, βρίσκεται υπό φυσιολογική κατάσταση ήπιας φλεγμονής (O'Hara and Shanahan 2006,

O'Flaherty et al. 2010). Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη δεν υπήρχαν ενδείξεις μη φυσιολογικής φλεγμονής σε καμία από τις επεμβάσεις, το οποίο ενισχύεται και από τα επίπεδα έκφρασης της *IgA* του βλεννογόνου του ειλεού τα οποία δεν άλλαξαν. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα ορνίθια είχαν βελτιωμένα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά και πεπτικότητα παρέχει περαιτέρω αποδείξεις για την απουσία φλεγμονής. Επιπρόσθετα, η ενσωμάτωση αβιλαμυκίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας μείωσε επίσης την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της TJ. Το τελευταίο θα μπορούσε να επεξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη τον υποτιθέμενο αντιφλεγμονώδη ρόλο της αβιλαμυκίνης και άλλων ΑΑΠ (Niewold 2007, Costa et al. 2011) σε απουσία προκλήσεων από παθογόνα όπως σε αυτή την εργασία.

Η άμυνα έναντι των παθογόνων και η διατήρηση της ομοιόστασης στο έντερο εξαρτώνται από οδούς σηματοδότησης που επάγεται από υποδοχείς (όπως οι TLRs) που ανήκουν στη φυσική ανοσία. Οι TLRs αναγνωρίζουν διατηρημένες μικροβιακές δομές στο περιβάλλον και καθοδηγούν τα ευκαρυωτικά κύτταρα σε επαρκή απόκριση. Οι TLR2 και TLR4 αναγνωρίζουν κυρίως συστατικά βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων αντίστοιχα (St. Paul et al. 2013). Ένας σημαντικός στόχος της σηματοδότησης των TLRs είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ενός βασικού ρυθμιστή ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων (Zhang and Ghosh 2001). Η προσθήκη του οξινιστή δεν επηρέασε την έκφραση των *TLR2B*, *TLR4* και *NFKBI* στο βλεννογόνου του ειλεού. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό θα μπορούσε να είναι ότι η ενσωμάτωση του οξινιστή δεν επηρέασε την μικροχλωρίδα του ειλεού. Πράγματι, είναι γνωστό ότι τα περισσότερα συμβιωτικά βακτήρια δεν ενεργοποιούν ή παρεμποδίζουν το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB και γενικά σε ένα υγιές έντερο το προφίλ έκφρασης των TLR παραμένει σε χαμηλά επίπεδα και συμβάλει στην ομοιόσταση του εντέρου (O'Hara and Shanahan 2006, Cario 2010). Από την άλλη πλευρά, η εισαγωγή της αβιλαμυκίνης μείωσε την έκφραση των *TLR2B*, *TLR4* και *NFKBI* στο βλεννογόνου του ειλεού. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την επαγόμενη μείωση των επιπέδων του βακτηριακού πληθυσμού *C. perfringens* subgroup από την αβιλαμυκίνη ή / και να οφείλεται στην αντί-φλεγμονώδη δράση της (Niewold 2007, Costa et al. 2011), μέσω μιας βακτήριο-ανεξάρτητης αναστολής των TLRs.

Συμπερασματικά, η ενσωμάτωση οξινιστή στο σιτηρέσιο βελτίωσε τις παραγωγικές αποδόσεις, την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, τα ποσοστά κατακρατηθείσας ενέργειας και επέδρασε θετικά στη διαχείριση τόσο του ειλεακού όσο και τυφλικού περιβάλλοντος. Επίσης η μελέτη έδωσε στοιχεία πιθανής συσχέτισης μεταξύ πεπτικών, ανοσιακών και μικροβιολογικών δεικτών με τη βελτιωμένη ανάπτυξη.

## 9. Σχολιασμός 2<sup>ης</sup> πειραματικής μελέτης - Τύπος προσθήκης προβιοτικού

Πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν τις ευεργετικές επιδράσεις μονό, ή πολυστέλεχων προβιοτικών στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Patterson and Burkholder 2003, Applegate *et al.* 2010, Lee *et al.* 2011, Amerah *et al.* 2013, Gutierrez- Fuentes *et al.* 2013, Mookiah *et al.* 2014, Zhang and Kim 2014). Καθώς η ζωτικότητα των προβιοτικών θεωρείται σημαντική παράμετρος της αποτελεσματικότητάς τους σχετικά πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι νεκρά στελέχη ίσως να επηρεάζουν θετικά την αποδοτικότητα των ζώων (Huang *et al.* 2004, Sakai *et al.* 2006, El Iraqi and Fayed 2012). Αυτή η διατριβή παρουσίασε ότι τα ορνίθια που κατανάλωσαν θερμικά αδρανοποιημένο ισοδύναμο με το ενεργό προβιοτικό εμφάνισαν βελτιωμένα παραγωγικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια την τελικής φάσης καθώς και για όλη τη διάρκεια του πειράματος (42 ημέρες) σε σύγκριση με τα ορνίθια που δεν κατανάλωσαν προβιοτικό.

Ο μηχανισμός δράσης του προβιοτικού σκευάσματος που περιέχει μόνο νεκρά βακτήρια θεωρείται ότι βασίζεται στην ανοσο-ρυθμιστική του ικανότητα (Adams 2010). Για παράδειγμα, προβιοτικά στελέχη φαίνεται να διατηρούν την ικανότητα προσκόλλησής τους μετά από αδρανοποίηση (Ouwehand *et al.* 2000). Επιπρόσθετα, η ικανότητα αδρανοποιημένων βακτηρίων να προκαλούν ανοσιακή απόκριση έχει αποδοθεί στο ότι τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος αναγνωρίζουν χαρακτηριστικά βακτηριακά κυτταρικά δομικά συστατικά (Taverniti and Guglielmetti 2011).

Όπως αναμενόταν, η προσθήκη της αβιλαμυκίνης ως ΑΑΠ είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ΑΖΒ και του ΣΕ στην φάση ανάπτυξης, τελική φάση και για όλο το πείραμα. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες οι οποίες χρησιμοποίησαν την αβιλαμυκίνη ως θετικό μάρτυρα (Miles *et al.* 2006, Mountzouris *et al.* 2010, Shim *et al.* 2012).

Η παρούσα διατριβή είχε ως σκοπό να ερευνήσει εάν η αποδοτικότητα του τύπου προσθήκης του προβιοτικού θα μπορούσε να αλλάξει εάν γινόταν ταυτόχρονη χορήγηση και ενός ΑΑΠ. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι εκτός από την ΑΖΒ κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης, δεν υπήρχαν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον τύπο προσθήκης του προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης για καμία από τις παραγωγικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν. Συνεπώς, η θετική δράση του ζωντανού και αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου δεν επηρεάζεται από την προσθήκη αβιλαμυκίνης και αντίστροφα.

Γενικά, έχει αποδειχτεί ότι τα μόνο- ή πολυστέλεχα προβιοτικά είναι δυνατόν να βελτιώσουν την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, αλλά η αποτελεσματικότητά τους είναι γνωστό ότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μερικοί εκ των οποίων είναι η σύσταση τους και το επίπεδο προσθήκης τους στο σιτηρέσιο (Arata 2008, Mountzouris *et al.* 2010, Sen *et al.* 2012). Στην παρούσα εργασία, τα ορνίθια που κατανάλωσαν ζωντανό προβιοτικό σε συγκέντρωση  $10^8$  CFU/kg τροφής δεν παρουσίασαν βελτίωση την ολική φαινομένη πεπτικότητα της ΞΟ σε σύγκριση με τα ορνίθια που δεν κατανάλωσαν προβιοτικό. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ίδιο προβιοτικό στην ίδια συγκέντρωση (Mountzouris *et al.* 2010). Ενδέχεται λοιπόν να υπήρξε αρνητική συνέργεια ανάμεσα στο ζωντανό προβιοτικό και στην αβιλαμυκίνη (επέμβαση ViP+A) η οποία να μείωσε την πεπτικότητα της ΞΟ στο επίπεδο του μάρτυρα (CoN). Πιθανόν μεγαλύτερη συγκέντρωση προβιοτικού να ήταν πιο αποτελεσματική σε περιπτώσεις που χορηγείται ταυτόχρονα και αντιμικροβιακό συστατικό όπως οι ΑΑΠ και τα κοκκιδιοστατικά, βέβαια μία τέτοια υπόθεση θα πρέπει να διερευνηθεί και πειραματικά.

Στην παρούσα διατριβή αναφέρεται για πρώτη φορά η επίδραση της προσθήκης αδρανοποιημένων βακτηριακών στελεχών επί της πεπτικότητας ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, τα ορνίθια που κατανάλωσαν αδρανοποιημένο τύπο είχαν σταθερά καλύτερη πεπτικότητα της ΞΟ και ΑΟ στον ειλέο και καλύτερη πεπτικότητα της ΞΟ, των ΛΟ και της ολικής πεπτικότητας σε σύγκριση με τα ορνίθια που κατανάλωσαν ζωντανό ή καθόλου προβιοτικό. Αντίθετα με το ζωντανό προβιοτικό, η συγχορήγηση του αδρανοποιημένου προβιοτικού με την αβιλαμυκίνη δε μείωσε την ολική πεπτικότητα των υπό μελέτη θρεπτικών συστατικών. Έχει προταθεί ότι η μέθοδος αδρανοποίησης ενός προβιοτικού (π.χ. θέρμανση, υπεριώδης ακτινοβολία, γ-ακτινοβολία, υψηλή πίεση) είναι δυνατό να επιδρά στην αποδοτικότητα των αδρανοποιημένων προβιοτικών (Ouwehand *et al.* 2000, Huang *et al.* 2004). Παρόλα αυτά, όχι άμεσα συγκρίσιμο, η προσθήκη ενός πολυστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος με μειωμένη ζωτικότητα λόγω της θέρμανσης στους  $70^\circ\text{C}$  για 36 ώρες βελτίωσε την κατακράτηση ΑΟ σε σύγκριση με το ίδιο πολυστέλεχο προβιοτικό που είχε θερμανθεί στους  $40^\circ\text{C}$  για 72 ώρες (Shim *et al.* 2012).

Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η αύξηση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών είναι επακόλουθο της αύξησης της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων. Σύμφωνα με τους αποτελέσματα της ομάδας μας (Palamidi *et al.* 2016a) η λιπολυτική ενεργότητα στο περιεχόμενο της νήστιδας ήταν σημαντικά αυξημένη, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την βελτίωση της ολικής φαινομένης πεπτικότητας των ΛΟ που παρατηρήθηκε. Επιπρόσθετα η

βελτίωση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της βελτίωσης της μορφολογίας του εντερικού επιθηλίου. Τα προβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν την μορφολογία του εντερικού επιθηλίου αυξάνοντας την επιφάνεια του λεπτού εντέρου το οποίο συμβάλει στην καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Awad *et al.* 2009, Perić *et al.* 2010, Sen *et al.* 2012, Tsirtsikos *et al.* 2012), φυσικά αυτός ο ισχυρισμός θα πρέπει να επαληθευτεί και πειραματικά.

Ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός δράσης των προβιοτικών θεωρείται η δυνατότητά τους να ρυθμίζουν τον εντερικό φραγμό και την ανοσία του ξενιστή επιτρέποντας την απελευθέρωση βιοενεργών συστατικών, όπως οι βλεννίνες, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (defensins), οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες (Kogut and Swaggerty 2012). Επομένως, σκοπός αυτής της διατριβής ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της προσθήκης ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού μεμονωμένα ή σε συνδυασμό αυτών με την αβιλαμυκίνη στην έκφραση επιλεγμένων κυτταροκινών και του iNOS σε δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστούς, και συγκεκριμένα στο σπλήνα και σε δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων. Ο σπλήνας έχει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της ανοσιακής αντίδρασης έναντι συστηματικών επίκτητων αντιγόνων (John 1994), ενώ οι δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων περιέχουν βλαστικά κέντρα και IgA-θετικά B κύτταρα και θεωρούνται πολύ σημαντικοί στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στον ξενιστή και στη μικροχλωρίδα (Brisbin *et al.* 2010). Σε αυτή την εργασία, η διαιτητική προσθήκη προβιοτικών δεν επηρέασε την σχετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με Th1 ανοσιακή απόκριση στο σπλήνα (*TGF-β4*, *IFN-γ*, *IL12*, *IL2*, *IL18* και *iNOS*) ή στους δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων (*TGF-β4*, *IL18*, *IL10*, *iNOS* και *IFN-γ*). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται μετά από τη χορήγηση του είδους *Bacillus subtilis* σε συγκέντρωση  $1,5 \times 10^5$  cfu/g τροφής η οποία δεν επηρέασε την γονιδιακή έκφραση των *IFN-γ*, *IL10* και *TNFSF15* (υπεροικογένεια των υποδοχέων των παραγόντων νέκρωσης των όγκων) στο έντερο (Lee *et al.* 2014b). Επιπλέον, η ενσωμάτωση ενός εμπορικού προβιοτικού σε συγκέντρωση  $1 \times 10^8$  cfu/g τροφής δεν άλλαξε την σχετική έκφραση των *IL1b*, *IL10* και *IL6* στον ειλέο (Chichlowski *et al.* 2007a). Παρόλα αυτά, όταν η αβιλαμυκίνη χορηγήθηκε μαζί με προβιοτικά υπήρχε σημαντική αλληλεπίδραση στα επίπεδα έκφρασης του *TGF-β4* και της *iNOS* στο σπλήνα και μόνο στην *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφαδένες.

Δεδομένου ότι σε επίπεδο σπλήνα δεν υπήρχε αύξηση στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της *IFN-γ* έτσι ώστε να υποθεθεί ότι υπάρχουν αλλαγές στο πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και στην ενεργοποίηση των μακροφάγων (Wigley and



Kaiser 2003, Takaki *et al.* 2006) είναι πολύ δύσκολο να κατανοηθεί ο φυσιολογικός ρόλος της μείωσης των επιπέδων έκφρασης του *TGF-β4* στην επέμβαση InP σε σύγκριση με τις επεμβάσεις ViP και CoN. Παρόλα αυτά υπάρχει μία εργασία που τα αποτελέσματα της μπορεί να μην είναι άμεσα συγκρίσιμα με της παρούσας εργασίας, αλλά αναφέρει ότι το επίπεδο προσθήκης του είδους *Lactobacillus acidophilus* σε ζώα απαλλαγμένα μικροβίων επηρέασε την απόκριση των Treg και την παραγωγή του TGF-β στο σπλήνα (Wen *et al.* 2012). Επομένως, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι ανάλογα με το προβιοτικό που χρησιμοποιείται παρουσιάζεται και διαφορετική ανοσιακή απόκριση.

Μεταξύ των διαφόρων παραγόντων που σχετίζονται με τη φλεγμονή που μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της *iNOS* (Brujeni *et al.* 2008), ένας βασικός παράγοντας που ελέγχει την έκφραση της *iNOS* είναι ο TGF-β, ο οποίος φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση της *iNOS* σε πολλά είδη κυττάρων (Berg *et al.* 2007). Επομένως, η μείωση της έκφρασης του *TGF-β4* που παρατηρήθηκε στην επέμβαση ViP+A στο σπλήνα θα μπορούσε να είναι σύμφωνη με την ταυτόχρονη αύξηση που σημειώθηκε στην *iNOS*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ταυτόχρονη χορήγηση του ζωντανού προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης ίσως να ενίσχυσε την ανοσιακή απόκριση σε συστηματικό επίπεδο.

Επιπλέον, το γεγονός ότι η έκφραση της *iNOS* μειώθηκε στους δευτερογενείς λεμφαδένες σε όλες τις επεμβάσεις σε σύγκριση με τον μάρτυρα (CoN), υποδηλώνει αντιφλεγμονώδη δράση που ασκείται από το ζωντανό ή το αδρανοποιημένο προβιοτικό ή και την αβιλαμυκίνη σε επίπεδο ιστού.

Η ενσωμάτωση της αβιλαμυκίνης στην τροφή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης της *IFN-γ* και της *iNOS* στους δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων. Η *IFN-γ* μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και έχει συσχετιστεί με την μόλυνση από βακτήρια, ιούς και παράσιτα (He *et al.* 2011). Δεδομένου ότι δεν εμφανίστηκε λοίμωξη και τα ορνίθια ήταν υγιή καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής εκτροφής, η μείωση των επιπέδων έκφρασης της *IFN-γ* και της *iNOS* θα μπορούσε να θεωρηθεί μία ωφέλιμη αντιφλεγμονώδη δράση μεσολαβούμενη από την αβιλαμυκίνη. Η αντιφλεγμονώδης δράση της αβιλαμυκίνης έχει αναφερθεί σε προηγούμενες έρευνες. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη αβιλαμυκίνης σε συγκέντρωση 8 mg/kg στο σιτηρέσιο ορνιθίων περιόρισε την ανοσιακή απόκριση και διέγειρε την παραγωγή σερουλοπλασμίνης στο αίμα (Bielecka *et al.* 2010). Επιπλέον, η κατανάλωση αβιλαμυκίνης σε συγκέντρωση 40 mg/kg σιτηρεσίου από χοιρίδια οδήγησε σε μείωση της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *NF-κB* και του αποπτωτικού παράγοντα *TNF-α* στον ειλέο και στη νήστιδα αντίστοιχα (Kroismayr *et al.* 2008). Η αντιφλεγμονώδης

δράση των ΑΑΠ η οποία ασκείται μέσω της αναστολής, αρκετών λειτουργιών φλεγμονωδών κυττάρων, χημειοταξίας, της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και παραγωγής αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών έχει προταθεί ως ο κύριος μηχανισμός ενίσχυσης της αποδοτικότητας των παραγωγικών ζώων (Niewold 2007). Πράγματι, η άσκοπη ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος (απουσία αντιγόνου) θα μπορούσε να έχει σημαντικό κόστος στη παραγωγικότητα και στην ανάπτυξη (Kogut and Swaggerty 2012).

Τα προβιοτικά είναι γνωστό ότι ωφελούν τον ξενιστή βελτιώνοντας την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας του (Fuller 1989). Συγκεκριμένα, βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus spp.* θεωρούνται ευεργετικά για την εντερική ομοιοστασία αφού παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων, βακτηριοσινών και άλλων μεταβολιτών και διεγείρουν το ανοσιακό σύστημα (Brisbin *et al.* 2011). Παρόλο που η ενσωμάτωση ζωντανού προβιοτικού τύπου δεν επηρέασε τους υπό εξέταση βακτηριακούς πληθυσμούς σε επίπεδο ειλεού στο τυφλό έντερο σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των *Lactobacillus spp.* στο περιεχόμενο. Σε σύγκριση με προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας όπου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες (Mountzouris *et al.* 2010) ή η μοριακή τεχνική της φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης (Mountzouris *et al.* 2015), η δυνατότητα ανίχνευσης της εν λόγω θετικής τροποποίησης στη συγκέντρωση των *Lactobacillus* έγινε δυνατή λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας και ακρίβειας της PCR πραγματικού χρόνου που εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή. Η επίδραση της αβιλαμυκίνης στη σύσταση της μικροχλωρίδας υποστηρίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα ευρήματα της παρούσας διατριβής. Πρώτον, η συγκέντρωση του γένους *Lactobacillus spp.* ήταν χαμηλότερη στα ορνίθια που έλαβαν αβιλαμυκίνη στο περιεχόμενο του ειλεού. Μειωμένη συγκέντρωση του γένους *Lactobacillus sp.* μετά από διαιτητική χορήγηση ΑΑΠ έχει αναφερθεί σε άλλες εργασίες (Knarreborg *et al.* 2002, Dumonceaux *et al.* 2006, Guban *et al.* 2006). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι, αν και η αύξηση του πληθυσμού *Lactobacillus spp.* σε επίπεδο τυφλού εντέρου θεωρείται ευεργετική, η αύξηση των επιπέδων του πληθυσμού *Lactobacillus spp.* στον ειλεό ενδέχεται να οδηγήσει σε μειωμένη απορρόφηση λίπους εξαιτίας της αποσύζευξης των χολικών αλάτων (Engberg *et al.* 2000). Επιπλέον, η αύξηση αυτή συνδέεται με αρνητικές επιπτώσεις στο σωματικό βάρος (Lin 2014). Δεύτερον, σε επίπεδο τυφλού εντέρου, η προσθήκη αβιλαμυκίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού *C. perfringens* subgroup Το είδος *C. perfringens* μπορεί να προκαλέσει νεκρωτική εντερίτιδα σε ορνίθια, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αιφνίδιο θάνατο με ποσοστά θνησιμότητας έως 50 %, ενώ οι υποκλινικές λοιμώξεις που προκαλεί το είδος *C. perfringens* σχετίζονται με χρόνια βλάβη του εντερικού βλεννογόνου (Caly *et al.* 2015). Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με μια

προηγούμενη μελέτη, στην οποία η προσθήκη αβιλαμυκίνης σε συγκέντρωση 10 ppm στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής οδήγησε σε μείωση του είδους *C. perfringens* στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου (Elwinger *et al.* 1998).

Ο φραγμός του εντέρου επιτυγχάνεται από την ικανότητα των εντεροκυττάρων να παράγουν ένα παχύ στρώμα βλέννας που εκκρίνεται από τα καλυκοειδή κύτταρα και διασκορπίζεται σε όλο το εντερικό επιθήλιο και από την ιδιαίτερη δομή των διακυτταρικών συνδέσεων του επιθηλίου (Caraldo *et al.* 2017). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα προβιοτικά μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με το φραγμό του εντέρου υπό κανονικές συνθήκες (Rajput *et al.* 2013, Dong *et al.* 2016, Gadde *et al.* 2017) υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Song *et al.* 2014) ή με διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (Li *et al.* 2015).

Στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκε μια σημαντική αλληλεπίδραση του τύπου προσθήκης του προβιοτικού στην γονιδιακή ρύθμιση της *CLDN1*. Οι κλαουδίνες αποτελούν το βασικό συστατικό των TJs. Η λειτουργία της *CLDN1*, είναι γνωστή για την σφράγιση των πόρων των διαύλων (Lee 2015). Η έκφραση της *CLDN1* είναι αυξημένη σε περίπτωση που υπάρχει ενεργή φλεγμονή για τη ρύθμιση της χρόνιας φλεγμονώδους εντερικής νόσου σε ανθρώπους (Weber *et al.* 2008). Στα ορνίθια, έχει αναφερθεί αυξημένη γονιδιακή έκφραση της *CLDN1* μετά από μόλυνση με δεσοξυνιβαλενόλη που συνδυάστηκε με έναν προσροφητικό παράγοντα στον ειλεό (Osselaere *et al.* 2013). Αντίθετα, μειωμένα επίπεδα μεταγράφων *CLDN1* στον ειλεό έχουν αναφερθεί σε ορνίθια που μολύνθηκαν με σαλμονέλα ηλικίας 21 ημερών το οποίο όμως συνοδευόταν από σημαντική μείωση της AZB (Zhang *et al.* 2012a). Σε αυτή τη μελέτη, τις μεγαλύτερες τιμές έκφρασης *CLDN1* έλαβε η επέμβαση CON σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις στον ειλεό. Τα αποτελέσματά μας μπορούν να υπογραμμίσουν ότι η προκύπτουσα μείωση της ρύθμισης της *CLDN1* από την προσθήκη οποιωνδήποτε από τα τρία πρόσθετα ή τους συνδυασμούς τους (αβιλαμυκίνη, ζωντανός τύπος, αδρανοποιημένος τύπος) είναι ένας μηχανισμός εξοικονόμησης ενέργειας απουσία φλεγμονής.

Η προσθήκη αβιλαμυκίνης οδήγησε σε μείωση της ρύθμισης του γονιδίου *TLR4* στον ειλεό. Αυτή η μείωση μπορεί να εννοηστωθεί μέσω της παρουσίας και της δράσης ορισμένων βακτηριακών ειδών, το οποίο μπορεί να επιβεβαιωθεί σε αυτή την έρευνα λόγω του ότι παρατηρήθηκαν αλλαγές στην μικροχλωρίδα του ειλεού. Ωστόσο, δεν πρέπει να αγνοείται ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης του *TLR4* θα μπορούσε να είναι ή / και αποτέλεσμα της αντιφλεγμονώδους δράσης της αβιλαμυκίνης (Niewold 2007, Brown *et al.* 2016).

Η χορήγηση ζωντανού προβιοτικού τύπου είχε μεγάλο αντίκτυπο στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων (*OCLN*, *NFKB1*, *TLR2B* και *TLR4*) που σχετίζονται με το φραγμό του τυφλού εντέρου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το τυφλό είναι το τμήμα του εντέρου με την υψηλότερη αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και μικροχλωρίδας και υπογραμμίζει την ικανότητα των προβιοτικών να τροποποιούν το οικοσύστημα του εντέρου.

Το έντερο εκτίθεται συνεχώς σε αντιγόνα που μπορούν να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση, η οποία χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση της οδού NFKB. Ένας από τους αρνητικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς της εν λόγω οδού είναι η μείωση της ρύθμισης της μεταγραφής των TLR και των σχετικών γονιδίων (Villena and Kitazawa 2014). Έχει αναφερθεί ότι η φυσιολογική μικροχλωρίδα και τα προβιοτικά στελέχη δρουν με αντί-φλεγμονώδη τρόπο μειώνοντας τα επίπεδα των TLRs (Shibolet and Podolsky 2007). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν δύο διαφορετικούς αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς, εκ των οποίων ο ένας είναι ανεξάρτητος της σηματοδότησης των TLR στον ειλέο ενώ ο άλλος διαμεσολαβείται από τους TLR στο τυφλό. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα σηματοδότησης από τους TLR στον ειλέο, επειδή δεν μετρήθηκε η έκφραση όλων των TLRs σε επίπεδο μεταγραφής, ενώ δεν υπήρχαν δεδομένα για την έκφρασή τους σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η μείωση της ρύθμισης των *TLR2* και *TLR4* σε ορνίθια έχει αναφερθεί επίσης μετά από την προσθήκη των προβιοτικών *in ovo*, που περιείχαν *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* και *Bifidobacterium bifidum* στους δευτερογενείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτογενής επίδραση των προβιοτικών είναι η μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα (Pender *et al.* 2016). Η ανοσορυθμιστική ικανότητα προβιοτικών στελεχών απομονωμένα από το εντερικό σύστημα ορνιθίων (δηλαδή του *L. salivarius*), όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη έχει αναφερθεί και *in vitro* (Brisbin *et al.* 2010).

Στο τυφλό έντερο παρατηρήθηκε επίδραση των πρόσθετων υλών στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του TJ και συγκεκριμένα στην *CLDN5* και *OCLN* αντίστοιχα. Όπως αναφέρουν οι Ozden *et al.* (2010) η έκφραση της *CLDN5* είναι πολύ μεγαλύτερη στην κρύπτη και στο κατώτερο επιθήλιο της λάχνης μέσα σε διασταυρωμένα σύμπλοκα στο έντερο των ορνιθίων, 2 ημέρες μετά την εκκόλαση, υποδηλώνοντας ότι η λειτουργία της *CLDN5* αφορά τόσο τη διευκόλυνση της κυτταρικής διαίρεσης όσο και τη ρύθμιση της έκκρισης μέσω παρακυτταρικών διαύλων (Ozden *et al.* 2010). Ακολούθως, έχει παρατηρηθεί ότι η αβιλαμυκίνη επιδρά στο εντερικό επιθήλιο, μειώνοντας το πάχος του βλεννογόνου (Kaczmarek *et al.* 2016). Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά, η μείωση της έκφρασης της *CLDN5* από την

αβιλαμυκίνη ίσως υποδεικνύει αλλαγές στην μορφολογία του επιθηλίου. Βέβαια αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί σε αυτή την εργασία από τη στιγμή που δεν μελετήθηκε η δομή του εντερικού επιθηλίου.

Η οκλουδίνη είναι ένα σημαντικό συστατικό των TJs. Ωστόσο, η κατασκευή των TJs και η λειτουργία του εντερικού φραγμού δεν εξαρτώνται από την οκλουδίνη (Groschwitz and Hogan 2009). Συνεπώς, το εύρημα της μειωμένης έκφρασης της οκλουδίνης από τη χορήγηση του ζωντανού προβιοτικού τύπου δεν μπορεί να αξιολογηθεί.

Συμπερασματικά, όλες οι πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν επέδρασαν θετικά στις παραγωγικές επιδόσεις και προκάλεσαν μια αντιφλεγμονώδη αντίδραση σε τοπικό επίπεδο. Η ενσωμάτωση του ζωντανού προβιοτικού επηρέασε θετικά την μικροχλωρίδα και τροποποίησε συστατικά της φυσικής ανοσίας κυρίως σε επίπεδο τυφλών εντέρων.

## 10. Γενικός σχολιασμός

Η διαμόρφωση της εντερικής μικροχλωρίδας μέσω διατροφικών επεμβάσεων με σκοπό να ωφεληθεί η «υγεία του εντέρου» του ξενιστή είναι ένα ζήτημα το οποίο συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διατήρηση της εντερικής ομοιοστασίας απαιτεί μια πολυδιάστατη προσέγγιση τόσο σε ανοσιακό και μικροβιολογικό επίπεδο όσο και στην πρόσληψη και αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών (Choct 2009). Πολυάριθμες εργασίες αναφέρουν ότι, η διαιτητική προσθήκη βιοενεργών συστατικών μπορεί να επηρεάσει τόσο την ανάπτυξη όσο και υγεία των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, το οποίο πιθανολογείται ότι επιτυγχάνεται μέσω της επίδρασης τους στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και ακολούθως στο περιβάλλον του εντερικού οικοσυστήματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη οξιμιστή ή προβιοτικού (ζωντανός ή αδρανοποιημένος τύπος) βελτίωσε τις αποδόσεις των ορνιθίων. Ωφέλιμη επίδραση της προσθήκης οξιμιστών στα παραγωγικά χαρακτηριστικά έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες, σε πειράματα που είτε η χορήγηση αφορούσε μεμονωμένα οργανικά οξέα (Abdel-Fattah *et al.* 2008, Galib Al-Kassi and Aqeel Mohssen 2009, Kim *et al.* 2009, Chowdhury *et al.* 2009) είτε μίγματα οργανικών οξέων (Galib Al-Kassi and Aqeel Mohssen 2009). Όσον αφορά την ενσωμάτωση ζωντανού τύπου του πολυστέλεχου προβιοτικού, υπάρχει μεγάλος όγκος εργασιών στην επιστημονική βιβλιογραφία που τεκμηριώνει την ευεργετική επίδραση των μονοστέλεχων ή πολυστέλεχων προβιοτικών στην ανάπτυξη των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Patterson and Burkholder 2003, Applegate *et al.* 2010, Amerah *et al.* 2013, Gutierrez- Fuentes *et al.* 2013, Mookiah *et al.* 2014, Zhang and Kim 2014). Παρόλο που η ζωτικότητα των προβιοτικών θεωρείται ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητά τους, υπάρχουν εργασίες στις οποίες η εισαγωγή αδρανοποιημένου τύπου προβιοτικών στο σιτηρέσιο επηρέασε θετικά την αποδοτικότητα κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Huang *et al.* 2004, El Iraqi and Fayed 2012). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έρχονται σε συμφωνία με τα παραπάνω παρουσιάζοντας βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών. Η θετική επίδραση των βιοενεργών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι σε συγκρίσιμα επίπεδα με την αβιλαμυκίνη η οποία αποδεδειγμένα δρα ως αυξητικός παράγοντας σε ορνίθια κρεοπαραγωγής (Mountzouris *et al.* 2010, 2011, Wealleans *et al.* 2017). Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω η ενσωμάτωση οξιμιστή, ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου στο σιτηρέσιο μπορούν να επιλεγούν ως μια βιώσιμη εναλλακτική των ΑΑΠ λύση για την εκτροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων.

Σημαντικός δείκτης για την εκτίμηση της γαστρεντερικής λειτουργίας είναι η πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και το ποσό της κατακρατηθείσας ενέργειας. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η προσθήκη οξινιστή βελτίωσε παραμέτρους της ολικής πεπτικότητας καθώς και της κατακρατηθείσας ενέργειας το οποίο έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερες έρευνες (Runho *et al.* 1997, Ao *et al.* 2009). Ο ζωντανός τύπος προβιοτικού μείωσε την ολική πεπτικότητα της ΞΟ και των ΑΟ το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τους Mountzouris *et al.* (2010) που χορήγησαν το ίδιο προβιοτικό στην ίδια συγκέντρωση ( $10^8$  CFU / kg τροφής) σε ένα μονοπαραγοντικό πείραμα και βρήκαν θετική ή καμία επίδραση στις παραμέτρους που εξέτασαν. Παρατηρώντας όμως τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναδεικνύεται ότι η αρνητική επίδραση του ζωντανού τύπου προβιοτικού επί την πεπτικότητα της ΞΟ οφείλεται στο ότι δεν υπήρχε συνέργεια του ζωντανού τύπου προβιοτικού με την αβιλαμυκίνη. Όσον αφορά το αδρανοποιημένο τύπο προβιοτικού, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης έρχονται να δώσουν καινούρια στοιχεία σχετικά με την θετική επίδραση της χορήγησής του στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, καθώς δεν υπάρχουν παρόμοιες εργασίες στα ορνίθια κρεοπαραγωγής.

Κύριος μηχανισμός της θετικής δράσης των οξινιστών και των προβιοτικών θεωρείται η διαμόρφωση και ευεργετική τροποποίηση της σύστασης της μικροχλωρίδας, η οποία επιτυγχάνεται μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών για τους οξινιστές και τα προβιοτικά, της άμεσης ή έμμεσης αντιμικροβιακής δράσης και του ανταγωνιστικού αποκλεισμού, αντίστοιχα. Λόγω του παραπάνω, χρησιμοποιώντας την PCR πραγματικού χρόνου, μίας ευαίσθητης μοριακής τεχνικής, εκτιμήθηκε η σύσταση της μικροχλωρίδας στον ειλεό και στο τυφλό έντερο, δύο πολύ σημαντικών σημείων του εντερικού σωλήνα, τόσο για την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών όσο και για την άμυνα του οργανισμού, αφού αποτελούν μέρη εισόδου παθογόνων προς τον οργανισμό (Wigley 2014, Stanley *et al.* 2014). Σε επίπεδο ειλεού δεν παρουσιάστηκε διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν μετά από τη προσθήκη του οξινιστή ή του ζωντανού ή του αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας (Palamidi and Mountzouris 2018) υπήρξε σημαντική αύξηση στην ενεργότητα των γλυκολυτικών ενζύμων με την προσθήκη του οξινιστή, που ίσως υποδεικνύει τη μεταβολική διέγερση της ειλεακής μικροχλωρίδας. Αντίθετα, η μικροχλωρίδα του περιεχομένου του τυφλού εντέρου τροποποιήθηκε με ωφέλιμο τρόπο μετά από την ενσωμάτωση του οξινιστή αυξάνοντας ευεργετικούς για την υγεία βακτηριακούς πληθυσμούς (Lopetuso *et al.* 2013).

Η διαμόρφωση του ανοσιακού συστήματος αποτελεί μία από τις δράσεις των οξιμιστών και των προβιοτικών. Υπάρχουν πολλές εργασίες που αναφέρουν ότι η προσθήκη οξιμιστών διεγείρει την ανοσοαπάντηση σε ορνίθια κρεοπαραγωγής το οποίο το αποτυπώνουν μέσω της αύξησης της πυκνότητας ανοσοκυττάρων ή μέσω του βάρους λεμφοειδών οργάνων ή μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης της σφαιρίνης γστο αίμα (Abdel-Fattah *et al.* 2008, Chowdhury *et al.* 2009, Haque *et al.* 2010, Ghazalah *et al.* 2011). Παρόλα αυτά οι βασικοί μηχανισμοί αυτού του φαινομένου είναι προς το παρόν άγνωστοι, αφού η επίδραση της διαιτητικής προσθήκης οξιμιστών επί των ρυθμιστών της ανοσιακής απόκρισης (κυτταροκινών) συστημακά και τοπικά δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Το κενό αυτό έρχεται να καλύψει η παρούσα διατριβή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης των κυτταροκινών παρατηρήθηκαν μεταβολές μόνο στους δευτερογενείς λεμφαδένες του τυφλού εντέρου. Η παρατηρούμενη επίδραση της προσθήκης οξιμιστή στη γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών *IL-18* και *IL-10* οφείλεται κατά κύριο λόγο στη συνέργεια των δύο πρόσθετων (οξιμιστής × αβιλαμυκίνη) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. *In vitro* εργασία αναφέρει ότι η ταυτόχρονη αύξηση των κυτταροκινών *IL-18* και *IL-10* αποτελεί ένδειξη ενεργοποίησης των NK κυττάρων χωρίς την περαιτέρω κινητοποίηση των Th1, υποδεικνύοντας ότι διεγείρεται η φυσική ανοσία χωρίς να ακολουθεί η δράση της επίκτητης ανοσίας (Cai *et al.* 1999). Παρατήρηση που μπορεί να επιβεβαιωθεί καθώς τα παραπάνω αποτελέσματα δεν συνοδεύτηκαν με αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της *IgA* στο τυφλό έντερο (Palamidi and Mountzouris 2018). Επίσης, η ενδεχόμενη ενεργοποίηση των NK κυττάρων δεν μπορεί να είναι αποτέλεσμα φλεγμονής διότι η γονιδιακή έκφραση του *NFKB1* στο τυφλό έντερο παρέμεινε αμετάβλητη.

Ο τύπος του προβιοτικού δεν επέδρασε στη γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών που μελετήθηκαν, αποτέλεσμα το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες (Chichlowski *et al.* 2007c, Lee *et al.* 2014b). Ωστόσο, ο συνδυασμός του ζωντανού προβιοτικού τύπου με την αβιλαμυκίνη ενδέχεται να ενίσχυσε την ανοσοαπόκριση σε συστηματικό επίπεδο καθώς οδήγησε σε μείωση της γονιδιακής έκφρασης του *TGF-β4* και αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της *iNOS* στο σπλήνα. Αντίθετα, σε τοπικό επίπεδο παρατηρήθηκε μια αντιφλεγμονώδης επίδραση που αποτυπώθηκε με την μείωση της γονιδιακής έκφρασης της *iNOS* σε όλες τις επεμβάσεις σε σύγκριση με το CoN. Σε μελέτη των Brisbin *et al.* (2010), οι οποίοι συν-καλλιέργησαν μονοπύρηνια κύτταρα του σπλήνα ή των δευτερογενών λεμφαδένων με διάφορα προβιοτικά στελέχη προερχόμενα από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα των ορνιθίων, παρατηρήθηκε ότι τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να διεγείρουν μια ανοσορυθμιστική απόκριση, η οποία ήταν διαφορετική τόσο για τη θέση όπου απομονώθηκαν τα κύτταρα όσο και για κάθε προβιοτικό στέλεχος (Brisbin *et al.* 2010). Αντίστοιχα, σε *in vivo* έρευνα που



εξετάστηκε η επίδραση της διαιτητικής προσθήκης του είδους *Bacillus substilis* (τριστελέχο) ή του *Propionibacterium acidipropionici* σε επίπεδο σπλήνα και δευτερογενών λεμφοδένων του τυφλού εντέρου παρατηρήθηκε διαφορετικό μοτίβο έκφρασης κυτταροκινών στο σπλήνα και τους δευτερογενείς λεμφοδένες του τυφλού εντέρου (Waititu *et al.* 2014).

Στην 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη, σε επίπεδο τυφλού εντέρου, ο συνδυασμός του οξιμιστή με την αβιλαμυκίνη επέδρασε ενεργοποιώντας τα ανοσοκύτταρα, ενώ στη 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη ο συνδυασμός του αδρανοποιημένου ή του ενεργού προβιοτικού μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με την αβιλαμυκίνη φαίνεται να είχαν τοπικά αντιφλεγμονώδη δράση. Στα δύο πειράματα η επίδραση εντοπίστηκε κυρίως στη ρύθμιση της φυσικής ανοσίας. Σε ζώα όπως τα ορνίθια κρεοπαραγωγής, τα οποία έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής η επίκτητη ανοσία δεν είναι παρούσα την πρώτη, ίσως και τη δεύτερη βδομάδα ζωής (Bar-Shira and Friedman 2006) με συνέπεια η φυσική ανοσία να είναι κύριας σημασίας για την προάσπιση της υγείας των ορνιθίων. Ωστόσο, η διέγερση της φυσικής ανοσίας ίσως οδηγεί σε δαπάνη θρεπτικών συστατικών (Klasing 2004) τα οποία μπορεί να χρησιμοποιούνταν από τον οργανισμό για παραγωγικούς σκοπούς. Επίσης, η μείωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών δεν έχει γίνει σαφές εάν είναι επιθυμητή, διότι σε ενδεχόμενη προσβολή από κάποιο παθογόνο ίσως η ανοσιακή απάντηση να μην είναι η κατάλληλη. Βασικό στοιχείο για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των πρόσθετων που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη επί της ανοσιακής απόκρισης θα αποτελέσει η εισαγωγή ενός μολυσματικού παράγοντα (παρουσία αντιγόνου) σε πειραματικό επίπεδο.

Τα εντεροκύτταρα εκφράζουν εξωκυττάριους υποδοχείς της φυσικής ανοσίας (TLRs) οι οποίοι συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιοστασίας του εντερικού οικοσυστήματος. Οι TLRs συμμετέχουν στη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος μέσω της αναγνώρισης διάφορων δομών που υπάρχουν σε μικροοργανισμούς (Keestra *et al.* 2013) αλλά συμβάλλουν και σε μη ανοσιακό επίπεδο επηρεάζοντας άμεσα τον εντερικό φραγμό (Cario *et al.* 2004). Στην 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη δεν υπήρξε αύξηση της έκφρασης και άρα ενεργοποίηση των TLR2 και TLR4 για κανέναν από τους παράγοντες που μελετήθηκαν, στον ειλέο ή στο τυφλό έντερο. Η αποφυγή της άσκοπης ενεργοποίησης των TLRs αποτελεί πολύ σημαντικό ζήτημα στο περιβάλλον του εντέρου όπου τα εντεροκύτταρα βρίσκονται σε συνεχή επαφή με αντιγόνα. Παρόλα αυτά, στην 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη η κατανάλωση ζωντανού προβιοτικού τύπου οδήγησε σε αρνητική ρύθμιση των TLR2 και TLR4 στο τυφλό έντερο, το οποίο υποδεικνύει την ικανότητα του ζωντανού προβιοτικού να διαχειρίζεται καλύτερα ένα περιβάλλον στο οποίο

εκτός του ότι η συγκέντρωση της μικροχλωρίδας είναι μεγάλη είναι και αυξημένη η μεταβολική της δραστηριότητα.

Η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις TJ πρωτεΐνες είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται για την διερεύνηση του εντερικού φραγμού, όπου ο τελευταίος αποτελεί σημαντικό συστατικό για την αξιολόγηση της εντερικής υγείας (Shao *et al.* 2013, Chen *et al.* 2015). Σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις TJ πρωτεΐνες έρχονται να δώσουν τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καθώς δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία η επίδραση των οξινιστών ή των αδρανοποιημένων βακτηριακών στελεχών επί των μεταβλητών αυτών σε ορνίθια κρεοπαραγωγής. Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη TJ μειώθηκε μετά από την προσθήκη οξινιστή ή / και αβιλαμυκίνης στον ειλέο, ενώ η χορήγηση ενεργού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού ή / και αβιλαμυκίνης μείωσε την έκφραση γονιδίων και στον ειλέο αλλά και στο τυφλό έντερο. Μείωση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό του φραγμού στον ειλέο έχει παρατηρηθεί μετά από πρόκληση, με εντερικά παθογόνα (*Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *C. perfringens type A*) και με λιποπολυσακχαρίτες (Liu *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012a, Li *et al.* 2015, Wang *et al.* 2018) ενώ αύξηση της έκφρασης έχει παρατηρηθεί παρουσία μυκοτοξινών (*CLDN1*, *CLDN5*, *ZO1* και *ZO2*) και σε περίπτωση που τα ορνίθια είχαν υποβληθεί σε θερμικό στρες (*CLDN5*, *CLDN1* και *ZO1*; Varasteh *et al.* 2015). Σε περιπτώσεις που υπάρχουν όμως τέτοιοι στρεσογόνοι παράγοντες υπάρχει άμεσος αντίκτυπος στα παραγωγικά χαρακτηριστικά, γεγονός το οποίο αποδίδεται, είτε στην εκτροπή των θρεπτικών συστατικών από την ανάπτυξη για τη σύνθεση μορίων του ανοσιακού συστήματος, είτε στη μείωση της πέψης και της απορρόφησης των θρεπτικών ουσιών λόγω της εντερικής δυσλειτουργίας που προκαλούν. Αντίθετα, στη παρούσα εργασία, η εισαγωγή οξινιστή στο σιτηρέσιο στην 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη, καθώς και η προσθήκη ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου στην 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη οδήγησαν σε βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών, ενώ αναφορικά με την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών παρατηρήθηκε βελτιωμένη ή σταθερή εικόνα σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, δεν υπήρξαν ενδείξεις φλεγμονώδους αντίδρασης στον ειλέο ή στο τυφλό έντερο, το οποίο προκύπτει από τα αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων *NFKB1* και *IgA* (Palamidi and Mountzouris 2018, Mountzouris-Palamidi *et al.* υπό κρίση) σε σχέση με το μάρτυρα. Συνεπώς, η μείωση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν τις TJ πρωτεΐνες που παρατηρήθηκε ίσως περιγράφει έναν μηχανισμό εξοικονόμησης ενέργειας, που προκύπτει λόγω της ικανότητας αυτών των βιοενεργών ουσιών να διαμορφώνουν ωφέλιμα το εντερικό οικοσύστημα.

Οι ΑΑΠ είναι γνωστοί για την ικανότητα τους να βελτιώνουν τα παραγωγικά χαρακτηριστικά όταν προστίθενται στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, ο μηχανισμός όμως που οδηγεί σε αυτά τα αποτελέσματα παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Καθώς η παρούσα εργασία χρησιμοποίησε την αβιλαμυκίνη ως θετικό μάρτυρα, μελετήθηκαν και πιθανοί μηχανισμοί δράσης της. Σε αυτό το επίπεδο, τα αποτελέσματα της σύστασης της μικροχλωρίδας καθώς και της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα και τον εντερικό φραγμό ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα. Η αντιμικροβιακή δράση της αβιλαμυκίνης που έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες (Elwinger *et al.* 1998, Paradis *et al.* 2016), επιβεβαιώθηκε και στα δύο πειράματα με την μείωση βακτηριακών πληθυσμών στον ειλέο (*C. perfringens* subgroup, 1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη) και στον ειλέο και στο τυφλό έντερο (*Lactobacillus spp.* και *C. perfringens* subgroup, 2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη). Επιπρόσθετα όμως της αντιμικροβιακής της δράσης, η αβιλαμυκίνη φάνηκε να δρα με αντιφλεγμονώδη τρόπο τροποποιώντας την έκφραση υποδοχέων της φυσικής ανοσίας στον ειλέο και μειώνοντας την έκφραση κυτταροκινών και μεσολαβητών της φλεγμονής σε συστημικό (1<sup>η</sup> πειραματική μελέτη) ή σε τοπικό επίπεδο (2<sup>η</sup> πειραματική μελέτη). Η άμεση ανοσοτροποποιητική δράση των ΑΑΠ σε παραγωγικά ζώα έχει προταθεί στο παρελθόν (Niewold 2007), ωστόσο στη παρούσα διατριβή δεν μπορεί να προκύψει από τα αποτελέσματα εάν η αβιλαμυκίνη τροποποίησε πρωταρχικά το ανοσιακό σύστημα ή τη σύσταση της μικροχλωρίδας.

## Η. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έρχονται να δώσουν καινούρια στοιχεία σχετικά με την επίδραση της χορήγησης οξινιστή, ζωντανού και αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου σε σημαντικούς βιοδείκτες του εντερικού οικοσυστήματος. Επίσης, η παρούσα μελέτη δίνει συμπληρωματικά στοιχεία στη βιβλιογραφία για το μηχανισμό δράσης των ΑΑΠ.
- ✓ Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν ότι ο οξινιστής και οι δύο τύποι προβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να έχουν θετική επίπτωση στην ανάπτυξη των ορνηθίων κρεοπαραγωγής.
- ✓ Η προσθήκη οξινιστή επέδρασε θετικά στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και αύξησε την κατακρατηθείσα ενέργεια. Ο αδρανοποιημένος τύπος προβιοτικού είχε θετική επίδραση στην ειλεακή και ολική πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών. Ο συνδυασμός της αβιλαμυκίνης με τον ζωντανό τύπο προβιοτικού δεν ήταν συνεργιστικός για την ειλεακή πεπτικότητα.
- ✓ Η ενσωμάτωση του οξινιστή και του ζωντανού προβιοτικού τύπου διαμόρφωσαν θετικά την μικροχλωρίδα του τυφλού εντέρου. Η αβιλαμυκίνη έδρασε αντιμικροβιακά τόσο σε επίπεδο ειλεού όσο και τυφλών εντέρων.
- ✓ Η ταυτόχρονη προσθήκη οξινιστή και αβιλαμυκίνης ενίσχυσε την φυσική ανοσιακή απόκριση στα τυφλά έντερα ενώ η προσθήκη ζωντανού ή αδρανοποιημένου προβιοτικού ή / και αβιλαμυκίνης είχε αντιφλεγμονώδη δράση. Ο ζωντανός τύπος προβιοτικού μείωσε στον ειλεό και στα τυφλά έντερα την έκφραση του *NFKB1* ενός από τους κεντρικούς μεσολαβητές της φλεγμονής. Η αβιλαμυκίνη έδρασε με αντιφλεγμονώδη τρόπο τόσο σε συστηματικό όσο και σε τοπικό επίπεδο.
- ✓ Ο οξινιστής επέδρασε στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό στον ειλεό και όχι στα τυφλά έντερα. Ο συνδυασμός οξινιστή και αβιλαμυκίνης έδρασε συνεργιστικά τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εντερικού φραγμού στον ειλεό. Ο ζωντανός τύπος προβιοτικού τροποποίησε την γονιδιακή έκφραση συστατικών του εντερικού φραγμού κυρίως στα

τυφλά έντερα. Αντίθετα, ο αδρανοποιημένος τύπος προβιοτικού δεν τροποποίησε τα συστατικά του εντερικού φραγμού, γεγονός το οποίο τονίζει ότι η ζωτικότητα και η μεταβολική δραστηριότητα των βακτηριακών κυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση τους με τα κύτταρα του ξενιστή.

Ανακεφαλαιώνοντας, όλα τα βιοενεργά συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν (οξιμιστής, ζωντανός και αδρανοποιημένος προβιοτικός τύπος) είχαν ευεργετική επίδραση στην ανάπτυξη των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Palamidi *et al.* 2016a, Palamidi *et al.* 2016b). Ο μηχανισμός που υποστηρίζει την αναβολική τους δράση μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην ικανότητα τους να αυξάνουν την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Palamidi *et al.* 2016a, Palamidi *et al.* 2016b). Η βελτίωση της πεπτικότητας που παρατηρήθηκε, ίσως οφείλεται στην αύξηση της ικανότητας του εντερικού σωλήνα να απορροφά θρεπτικά συστατικά, γεγονός το οποίο μπορεί να συνδέεται με αλλαγή της δομής του εντέρου. Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, η τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών του εντερικού φραγμού, της σύστασης της μικροχλωρίδας και η αποφυγή της άσκοπης ενεργοποίησης των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας, που παρατηρήθηκαν με την προσθήκη οξιμιστή ή ζωντανού προβιοτικού, αποτελούν δυνητικά μηχανισμούς εξοικονόμησης ενέργειας προς όφελος της ανάπτυξης (Palamidi and Mountzouris 2018, Mountzouris-Palamidi *et al.* υπό κρίση). Αναφορικά, με την προσθήκη του αδρανοποιημένου προβιοτικού τύπου, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής και συγκεκριμένα η αύξηση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, που αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, αναμένεται να δώσει το έναυσμα για νέες μελέτες.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μπορεί να αποτελέσει σημείο αναφοράς για την περαιτέρω αξιολόγηση της ανοσιακής αντίδρασης κατά την διαιτητική προσθήκη βιοενεργών ουσιών υπό συνθήκες στρες (π.χ. θερμικό ή ανοσιακό στρες). Ο μηχανισμός της βελτίωσης της πεπτικότητας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης τόσο σε επίπεδο επιθηλίου όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Η διερεύνηση των βακτηριακών πληθυσμών σε επίπεδο είδους θα παρέχει πολύτιμα στοιχεία στην έρευνα του εντερικού οικοσυστήματος διότι θα προσδιοριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τυχόν αλλαγές της εντερικής μικροχλωρίδας.

## Θ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Abdel-Fattah, S. A., El-Sanhoury, M. H., El-Mednay, N. M. and Abdel-Azeem, F.** 2008. Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *International Journal of Poultry Science* **7**: 215–222.

**Adams, C. A.** 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews* **23**: 37–46.

**Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., Mir, M. S. and Rehman, M.** 2010. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International* **2010**: 479485.

**Al-Asmakh, M. and Zadjali, F.** 2015. Use of germ-free animal models in microbiota-related research. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 1583–1588.

**Aliakbarpour, H. R., Chamani, M., Rahimi, G., Sadeghi, A. A. and Qujeq, D.** 2012. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **25**: 1285–1293.

**Amerah, A. M., Quiles, A., Medel, P., Sánchez, J., Lehtinen, M. J. and Gracia, M. I.** 2013. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. *Animal Feed Science and Technology* **180**: 55–63.

**Ao, T., Cantor, A. H., Pescatore, A. J., Ford, M. J., Pierce, J. L. and Dawson, K. A.** 2009. Effect of enzyme supplementation and acidification of diets on nutrient digestibility and growth performance of broiler chicks. *Poultry Science* **88**: 111–117.

**Apajalahti, J.** 2005. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. *The Journal of Applied Poultry Research* **14**: 444–453.

**Apata, D.** 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**: 1253–1258.

**Applegate, T. J., Klose, V., Steiner, T., Ganner, A. and Schatzmayr, G.** 2010. Probiotics and phytochemicals for poultry: Myth or reality? *The Journal of Applied Poultry Research* **19**: 194–210.

**Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S. and Bohm, J.** 2009. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science* **88**: 49–56.

**Awad, W. A., Hess, C. and Hess, M.** 2017. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins* **9**: doi: 10.3390/toxins9020060.

**Awad, W., Ghareeb, K. and Böhm, J.** 2008. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences* **9**: 2205–2216.

**Bai, S. P., Wu, A. M., Ding, X. M., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K. Y. and Chio, J. S.** 2013.

Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science* **92**: 663–670.

**Bamias, G., Corridoni, D., Pizarro, T. T. and Cominelli, F.** 2012. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine* **59**: 451–459.

Bar-Shira, E., Friedman, A. (2006). Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. *Developmental and Comparative Immunology*. 30:930-941.

**Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A. and Bauer, H. C.** 2010. The dual role of Zonula Occludens (ZO) proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**: 1–11.

**Berg, D. T., Gupta, A., Richardson, M. A., O'Brien, L. A., Calnek, D. and Grinnell, B. W.** 2007. Negative regulation of inducible nitric-oxide synthase expression mediated through transforming growth factor- $\beta$ -dependent modulation of transcription factor TCF11. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 36837–36844.

**Bielecka, M., Smoragiewicz, W., Siwicki, A. K., Wójcik, R., Biedrzycka, E., Orłowski, A., Kask, S., Jankowski, J., Karska-Wysocki, B. and Ham, D.** 2010. The effect of various probiotic strains or avilamycin feed additive on immune defense markers and acute-phase response to Salmonella infection in chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2**: 175–185.

**Biggs, P. and Parsons, C. M.** 2008. The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poultry Science* **87**: 2581–2589.

**Bjerrum, L., Engberg, R. M., Leser, T. D., Jensen, B. B., Finster, K. and Pedersen, K.** 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science* **85**: 1151–1164.

**Blasius A.L., Beutler B.** 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**: 305–315.

**Boll, R., Hofmann, C., Heitmann, B., Hauser, G., Glaser, S., Kosłowski, T., Friedrich, T. and Bechthold, A.** 2006. The active conformation of avilamycin a is conferred by AviX12, a radical AdoMet enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 14756–14763.

**Bortoluzzi, C., Pedroso, A. A., Mallo, J. J., Puyalto, M., Kim, W. K. and Applegate, T. J.** 2017. Sodium butyrate improved performance while modulating the cecal microbiota and regulating the expression of intestinal immune-related genes of broiler chickens. *Poultry Science* **96**: 3981–3993.

**Bouzaine, T., Dauphin, R., Thonart, P., Urdaci M. and Hamdi. M.** 2005. Adherence and colonization properties of Lactobacillus rhamnosus TB1, a broiler chicken isolate. *Letters in Applied Microbiology* **40**: 391-396.

**Brisbin, J. T., Gong, J., Parvizi, P. and Sharif, S.** 2010. Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**: 1337–1343.

**Brisbin, J. T., Gong, J. and Sharif, S.** 2008. Interactions between commensal bacteria and the

gut-associated immune system of the chicken. *Animal Health Research Reviews* **9**: 101–110.

**Brisbin, J. T., Gong, J., Orouji, S., Esufali, J., Mallick, A. I., Parvizi, P., Shewen, P. E., Sharif, S.** 2011. Oral treatment of chickens with lactobacilli influences elicitation of immune responses. *Clinical and Vaccine Immunology* **18**: 1447-1455.

**Brown, K., Zaytsoff, S. J. M., Uwiera, R. R. E. and Inglis, G. D.** 2016. Antimicrobial growth promoters modulate host responses in mice with a defined intestinal microbiota. *Scientific Reports* **6**: 38377.

**Brujeni, G. N., Teshfam, M. and Hassanpour, H.** 2008. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of iNOS in chicken macrophages. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* **2**: 99–104.

**Brüssow, H.** 2017. Adjuncts and alternatives in the time of antibiotic resistance and in-feed antibiotic bans. *Microbial Biotechnology* **10**: 674–677.

**Burkholder, K. M., Thompson, K. L., Einstein, M. E., Applegate, T. J. and Patterson, J. A.** 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. *Poultry Science* **87**: 1734–1741.

**Cai, G., Kastelein, R. A. and Hunter, C. A.** 1999. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- $\gamma$  when combined with IL-18. *European Journal of Immunology* **29**: 2658–2665.

**Caly, D. L., D’Inca, R., Auclair, E. and Drider, D.** 2015. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A microbiologist’s perspective. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1336.

**Capaldo, C. T., Powell, D. N. and Kalman, D.** 2017. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *Journal of molecular medicine* **95**: 927–934.

**Cario, E.** 2010. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: A decade later. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**: 1583–1597.

**Cario, E., Gerken, G. and Podolsky, D. K.** 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* **127**: 224–238.

**Chalghoumi, R., Marcq, C., Thewis, A., Portetelle, D. and Beckers, Y.** 2009. Effects of feed supplementation with specific hen egg yolk antibody (immunoglobulin Y) on *Salmonella* species cecal colonization and growth performances of challenged broiler chickens. *Poultry Science* **88**: 2081–2092.

**Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Lipman, L. J. A. and Van Knapen, F.** 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science* **83**: 330–334.

**Chen, J., Tellez, G., Richards, J. D. and Escobar, J.** 2015. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science* **2**: 14.

**Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., Sawada N.** 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1778**: 588–600.

**Chichlowski, M., Croom, J., McBride, B. W., Daniel, L., Davis, G. and Koci, M. D.** 2007a.



Direct-fed microbial PrimaLac and salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in the broiler chick. *Poultry Science* **86**: 1100–1106.

**Chichlowski, M., Croom, J., McBride, B. W., Havenstein, G. B. and Koci, M. D.** 2007b. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: A brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science* **6**: 694–704.

**Chichlowski, M., Croom, W. J., Edens, F. W., McBride, B. W., Qiu, R., Chiang, C. C., Daniel, L. R., Havenstein, G. B. and Koci, M. D.** 2007c. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. *Poultry Science* **86**: 1121–1132.

**Choct, M.** 2009. Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science* **50**: 9–15.

**Chowdhury, R., Islam, K. M. S., Khan, M. J., Karim, M. R., Haque, M. N., Khatun, M. and Pesti, G. M.** 2009. Effect of citric acid, avilamycin, and their combination on the performance, tibia ash, and immune status of broilers. *Poultry Science* **88**: 1616–1622.

**Clifford, R. J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D. V., Kwak, Y. I., Waterman, P. E., Lesho, E. P. and Mc Gann, P.** 2012. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PLoS One* **7**: e48558.

**Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R. and Tiedje, J. M.** 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **42**: D633–D642.

**Collins, M. M., Baumholtz, A. I. and Ryan, A. K.** 2012. Claudin-5 expression in the vasculature of the developing chick embryo. *Gene Expression Patterns* **12**: 123–129.

**Collins, M. M., Baumholtz, A. I. and Ryan, A. K.** 2013. Claudin family members exhibit unique temporal and spatial expression boundaries in the chick embryo. *Tissue Barriers* **1**: e24517.

**Corrigan, A., De Leeuw, M., Penaud-Frézet, S., Dimova, D. and Murphy, R. A.** 2015. Phylogenetic and functional alterations in bacterial community compositions in broiler ceca as a result of mannan oligosaccharide supplementation. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 3460–3470.

**Costa, E., Uwiera, R. R., Kastelic, J. P., Selinger, L. B. and Inglis, G. D.** 2011. Non-therapeutic administration of a model antimicrobial growth promoter modulates intestinal immune responses. *Gut Pathogens* **3**: 14.

**Cowieson, A. J. and Adeola O.** 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science*. **84**: 1860–1867.

**Cox, C. M., Sumners, L.H., Kim, S., McElroy, A.P., Bedford, M. R., Dalloul R. A.** 2010. Immune responses to dietary  $\beta$ -glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge, *Poultry Science*, Volume 89, Issue 12, 1 December, Pages 2597–2607,

**Cressman, M. D., Yu, Z., Nelson, M. C., Moeller, S. J., Lilburn, M. S. and Zerby, H. N.** 2010. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6572–6582.

**Crhanova, M., Hradecka, H., Faldynova, M., Matulova, M., Havlickova, H., Sisak, F. and Rychlik, I.** 2011. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infection and Immunity* **79**: 2755–2763.

**Czerwiński, J., Hojberg, O., Smulikowska, S., Engberg, R. M. and Mieczkowska, A.** 2010. Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. *British Poultry Science* **51**: 258–269.

**Degen, W. G. J., Van Daal, N., Van Zuilekom, H. I., Burnside, J. and Schijns, V. E. J. C.** 2004. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *Journal of Immunology* **172**: 4371–4380.

**Dehghani-Tafti, N. and Jahanian, R.** 2016. Effect of supplemental organic acids on performance, carcass characteristics, and serum biochemical metabolites in broilers fed diets containing different crude protein levels. *Animal Feed Science and Technology* **211**: 109–116.

**Delroisse, J.-M., Boulvin, A.-L., Parmentier, I., Dauphin, R. D., Vandenbol, M. and Portetelle, D.** 2008. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiological Research* **163**: 663–670.

**Dibaji, S. M., Seidavi, A., Asadpour, L. and Moreira da Silva, F.** 2014. Effect of a synbiotic on the intestinal microflora of chickens. *The Journal of Applied Poultry Research* **23**: 1–6.

**Dibner, J. J. and Buttin, P.** 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *The Journal of Applied Poultry Research* **11**: 453–463.

**Dibner, J. J. and Richards, J. D.** 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* **84**: 634–643.

**Dibner, J. J., Richards, J. D. and Knight, C. D.** 2008. Microbial Imprinting in Gut Development and Health. *The Journal of Applied Poultry Research* **17**: 174–188.

**Dong, Z. L., Wang, Y. W., Song, D., Hou, Y. J., Wang, W. W., Qi, W. T., Yun, T. T. and Li, A. K.** 2016. The effects of dietary supplementation of pre-microencapsulated *Enterococcus faecalis* and the extract of *Camellia oleifera* seed on growth performance, intestinal morphology, and intestinal mucosal immune functions in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **212**: 42–51.

**Drakes, M., Blanchard, T. and Czinn, S.** 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and Immunity* **72**: 3299–3309.

**Dumonceaux, T. J., Hill, J. E., Briggs, S. A., Amoako, K. K., Hemmingsen, S. M. and Van Kessel, A. G.** 2006. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target. *Journal of Microbiological Methods* **64**: 46–62.

**EFSA FEEDAP Panel.** 2014. Scientific Opinion on the safety and efficacy of sorbic acid and potassium sorbate when used as technological additives for all animal species. *EFSA Journal* **12**: 3792.

**EFSA FEEDAP Panel.** 2015. Scientific Opinion on the safety and efficacy of citric acid when used as a technological additive (acidity regulator) for all animal species. *EFSA Journal* **13**: 4010.

**Elias, B. C., Suzuki, T., Seth, A., Giorgianni, F., Kale, G., Shen, L., Turner, J. R., Naren,**

- A., Desiderio, D. M. and Rao, R.** 2009. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in Occludin Prevents Its Interaction with ZO-1 and Destabilizes Its Assembly at the Tight Junctions. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 1559–1569.
- Elwinger, K., Berndtson, E., Engström, B., Fossum, O. and Waldenstedt, L.** 1998. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica* **39**: 433–441.
- Engberg, R. M., Hedemann, M. S., Leser, T. D. and Jensen, B. B.** 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflor
- Ewing, W. and Cole, D.** 1994. The Living Gut: An Introduction to Micro-organisms in Nutrition, Context Dungannon, Co. Tyrone, N.(Ireland).a and performance of broilers **9**: 1311–1319.
- Fajardo, P., Pastrana, L., Méndez, J., Rodríguez, I., Fuciños, C. and Guerra, N. P.** 2012. Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens. *The Scientific World Journal* **2012**: 1–9.
- FAO/WHO.** (2006.). Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO Food and Nutrition Paper.
- Fernandez-Rubio, C., Ordonez, C., Abad-Gonzalez, J., Garcia-Gallego, A., Honrubia, M. P., Mallo, J. J. and Balana-Fouce, R.** 2009. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella enteritidis infection. *Poultry Science* **88**: 943–948.
- Fink-Gremmels, J.** 2012. Animal feed contamination : effects on livestock and food safety (Woodhead Publishing Limited).
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology* **66**: 365–378.
- Gadde, U., Oh, S. T., Lee, Y. S., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T. and Lillehoj, H. S.** 2017. The effects of direct-fed microbial supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immune status, and epithelial barrier gene expression in broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **9**: 397–405.
- Gaggia, F., Mattarelli, P. and Biavati, B.** 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* **141**: S15–S28.
- Galib Al-Kassi, A. and Aqeel Mohssen, M.** 2009. Comparative study between single organic acid effect and synergistic organic acid effect on broiler performance. *Pakistan Journal of Nutrition* **8**: 896–899.
- Garcia, V., Catala-Gregori, P., Hernandez, F., Megias, M. D. and Madrid, J.** 2007. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* **16**: 555–562.
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W. and Bryant, S. H.** 2010. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research* **38**: D492–D496.
- Ghazalah, A. A., Atta, A. M., Elkloub, K., Moustafa, M. E. and Shata, R. F. H.** 2011. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, nutrients digestibility and health of broiler chicks. *International Journal of Poultry Science* **10**: 176–184.

- Giannenas, I., Papanephytou, C., Tsalie, E., Triantafyllou, E., Tontis, D. and Kontopidis, G.** 2014. The effects of benzoic acid and essential oil compounds in combination with protease on the performance of chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* **23**: 73–81.
- Gilani, S., Howarth, G. S., Kitessa, S. M., Tran, C. D., Forder, R. E. A. and Hughes, R. J.** 2017. New biomarkers for increased intestinal permeability induced by dextran sodium sulphate and fasting in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **101**: e237–e245.
- Göbel, T. W., Schneider, K., Schaerer, B., Mejri, I., Puehler, F., Weigend, S., Staeheli, P. and Kaspers, B.** 2003. IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *Journal of Immunology* **171**: 1809–1815.
- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Sabour, P. M., Wheatcroft, R. and Chen, S.** 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiology Letters* **208**: 1–7.
- Gong, J., Si, W., Forster, R. J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C. and Han, Y.** 2007. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 147–157.
- Goodarzi Borojani, F., Vahjen, W., Mader, A., Knorr, F., Ruhnke, I., Röhe, I., Hafeez, A., Villodre, C., Männer, K. and Zentek, J.** 2014. The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science* **93**: 1440–1452.
- Groschwitz, K. R. and Hogan, S. P.** 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124**: 3–20.
- Gu, J., Ruan, X., Huang, Z., Chen, J. and Zhou, J.** 2010. Identification of functional domains of chicken interleukin 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **134**: 230–238.
- Guban, J., Korver, D. R., Allison, G. E. and Tannock, G. W.** 2006. Relationship of dietary antimicrobial drug administration with broiler performance, decreased population levels of *Lactobacillus salivarius*, and reduced bile salt deconjugation in the ileum of broiler chickens. *Poultry Science* **85**: 2186–2194.
- Guide, C. B. M.** 2012. COBB Broiler Management Guide.
- Gunal, M., Yayli, G., Kaya, O., Karahan, N. and Sulak, O.** 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science* **5**: 149–155.
- Gupta, S. K., Bajwa, P., Deb, R., Chellappa, M. M. and Dey, S.** 2014. Flagellin a toll-like receptor 5 agonist as an adjuvant in chicken vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology* **21**: 261–270.
- Gutierrez- Fuentes, C. E., Zuniga-Oro, L. A., Vicente, J. L., Hernandez-, X., Menconi, A., Kuttappan, V. A., Kallapura, G., Latorre, J. D., Layton, S., Hargis, B. M. and Tellez, G.** 2013. Effect of a lactic acid bacteria based probiotic, FloraMax-B11®, on performance, bone qualities and morphometric analysis of broiler chickens: An economic analysis. *International Journal of Poultry Science* **12**: 322–327.

- Haghighi, H. R., Gong, J., Gyles, C. L., Hayes, M. A., Zhou, H., Sanei, B., Chambers, J. R. and Sharif, S.** 2006. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology* **13**: 975–980.
- Hamed, D. M. and Hassan, A. M. A.** 2013. Acids supplementation to drinking water and their effects on Japanese quails experimentally challenged with *Salmonella enteritidis*. *Research in Zoology* **3**: 15–22.
- Han, G. G., Kim, E. B., Lee, J., Lee, J.-Y., Jin, G., Park, J., Huh, C.-S., Kwon, I.-K., Kil, D. Y., Choi, Y.-J. and Kong, C.** 2016. Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *SpringerPlus* **5**: 911.
- Haque, M. N., Islam, K. M. S., Akbar, M. A., Chowdhury, R., Khatun, M., Karim, M. R. and Kempainen, B. W.** 2010. Effect of dietary citric acid, flavomycin and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broiler. *Canadian Journal of Animal Science* **90**: 57–63.
- Hashemi, S. R., Zulkifli, I., Davoodi, H., Zunita, Z. and Ebrahimi, M.** 2012. Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifiers. *Animal Feed Science and Technology* **178**: 167–174.
- Hassan, H. M. A., Mohamed, M. A., Youssef, A. W. and Hassan, E. R.** 2010. Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance and intestinal microflora of broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **23**: 1348–1353.
- He, H., Genovese, K. J. and Kogut, M. H.** 2011. Modulation of chicken macrophage effector function by TH1/TH2 cytokines. *Cytokine* **53**: 363–369.
- Higgins, S. E., Erf, G. F., Higgins, J. P., Henderson, S. N., Wolfenden, A. D., Gaona-Ramirez, G. and Hargis, B. M.** 2007. Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of salmonella enteritidis by abdominal exudate Cells. *Poultry Science* **86**: 2315–2321.
- Hong, Y. H., Lillehoj, H. S., Lillehoj, E. P. and Lee, S. H.** 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **114**: 259–272.
- Horn, N. L., Donkin, S. S., Applegate, T. J. and Adeola, O.** 2009. Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and White Pekin ducklings to dietary threonine. *Poultry Science* **88**: 1906–1914.
- Houshmand, M., Azhar, K., Zulkifli, I., Bejo, M. and Kamyab, A.** 2012. Effects of non-antibiotic feed additives on performance, immunity and intestinal morphology of broilers fed different levels of protein. *South African Journal of Animal Science* **42**: 23–32.
- Huang, M. K., Choi, Y. J., Houde, R., Lee, J.-W., Lee, B. and Zhao, X.** 2004. Effects of lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. *Poultry Science* **83**: 788–795.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R. and Immerseel, F. Van.** 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* **187**: 182–188.
- Immerseel, F. Van, Buck, J. De, Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F. and**

**Ducatelle, R.** 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology* **33**: 537–549.

Jin, L., Ho, Y., Abdullah N. and Jalaludin. S. 1997. Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal* **53**:351-368.

**Van Immerseel, F., Ducatelle, R., De Vos, M., Boon, N., Van De Wiele, T., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Sas, B., Louis, P. and Flint, H. J.** 2010. Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal of Medical Microbiology* **59**: 141–143.

**Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R.** 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology* **35**: 182–188.

**Iqbal, M., Philbin, V. J., Withanage, G. S. K., Wigley, P., Beal, R. K., Goodchild, M. J., Barrow, P., McConnell, I., Maskell, D. J., Young, J., Bumstead, N., Boyd, Y. and Smith, A. L.** 2005. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity* **73**: 2344–2350.

**El Iraqi, K. G. and Fayed, R. H.** 2012. Effect of yeast as feed supplement on behavioural and productive performance of broiler chickens. *Life Science Journal* **9**: 4026-4031.

**Jang, I., Kang, S. and Ko, Y.** 2013. Influence of plum (*Prunus mume* Siebold and Zucc.) products on growth performance, intestinal function and immunity in broiler chicks. *The Journal of Poultry Science* **50**: 28–36.

**John, J. L.** 1994. The avian spleen: a neglected organ. *The Quarterly Review of Biology* **69**: 327–351.

**Joly, P., Falconnet, P.-A., Andre, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J. and Jarraud, S.** 2006. Quantitative real-time legionella PCR for Environmental water samples: data interpretation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2801–2808.

**Jozefiak, D., Kaczmarek, S. and Rutkowski, A.** 2010. The effects of benzoic acid supplementation on the performance of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **94**: 29–34.

**Józefiak, D., Rutkowski, A. and Martin, S. A.** 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: A review **113**:1-15

**Kaczmarek, S. A., Barri, A., Hejdysz, M. and Rutkowski, A.** 2016. Effect of different doses of coated butyric acid on growth performance and energy utilization in broilers. *Poultry Science* **95**: 851–859.

**Kaiser, P.** 2010. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathology* **39**: 309–324.

**Kaiser, P., Poh, T. Y., Rothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania, U. S., Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M., Bumstead, N., Kaufman, J. and Young, J. R.** 2005. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **25**: 467–484.

**Kaiser, P., Underwood, G. and Davison, F.** 2003. Differential cytokine responses following

- Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *Journal of Virology* **77**: 762–768.
- Keestra, A. M., De Zoete, M. R., Bouwman, L. I., Vaezirad, M. M. and Van Putten, J. P. M.** 2013. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental & Comparative Immunology* **41**: 316–323.
- Khan, S. H. and Iqbal, J.** 2016. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of Applied Animal Research* **44**: 359–369.
- Kierończyk, B., Sassek, M., Pruszyńska-Oszmałek, E., Kołodziejcki, P., Rawski, M., Świątkiewicz, S. and Józefiak, D.** 2017. The physiological response of broiler chickens to the dietary supplementation of the bacteriocin nisin and ionophore coccidiostats. *Poultry Science* **96**: 4026–4037.
- Kim, D. W., Kim, J. H., Kim, S. K., Kang, G. H., Kang, H. K., Lee, S. J. and Kim, S. H.** 2009. A study on the efficacy of dietary supplementation of organic acid mixture in broiler chicks. *Journal of Animal Science and Technology* **3**: 207–216.
- Kim, G.-B., Seo, Y. M., Kim, C. H. and Paik, I. K.** 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science* **90**: 75–82.
- Kim, S., Faris, L., Cox, C. M., Sumners, L. H., Jenkins, M. C., Fetterer, R. H., Miska, K. B. and Dalloul, R. A.** 2012. Molecular characterization and immunological roles of avian IL-22 and its soluble receptor IL-22 binding protein. *Cytokine* **60**: 815–827.
- Kim, S. J., Lee, K. W., Kang, C. W., and An, B. K.** 2016. Growth performance, relative meat and organ weights, cecal microflora, and blood characteristics in broiler chickens fed diets containing different nutrient density with or without essential oils. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. **29**, 549-554.
- Knarreborg, A., Simon, M. A., Engberg, R. M., Jensen, B. B. and Tannock, G. W.** 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5918–5924.
- Kogut, M. H.** 2013. The gut microbiota and host innate immunity: Regulators of host metabolism and metabolic diseases in poultry? *The Journal of Applied Poultry Research* **22**: 637–646.
- Kogut, M. H. and Arsenault, R. J.** 2016. Editorial: Gut health: The new paradigm in food animal production. *Frontiers in Veterinary Science* **3**: 71.
- Kogut, M. H., Iqbal, M., He, H., Philbin, V., Kaiser, P. and Smith, A.** 2005. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Developmental & Comparative Immunology* **29**: 791–807.
- Kogut, M. H. and Swaggerty, C. L.** 2012. Effects of prebiotics and probiotics on the host immune response, *Direct-fed microbials and prebiotics for animals*, pp. 61–72 (New York, NY, Springer New York).
- Kozakova, H., Schwarzer, M., Tuckova, L., Srutkova, D., Czarnowska, E., Rosiak, I., Hudcovic, T., Schabussova, I., Hermanova, P., Zakostelska, Z., Aleksandrak-**

- Piekarczyk, T., Koryszewska-Baginska, A., Tlaskalova-Hogenova, H. and Cukrowska, B.** 2015. Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. *Cellular and Molecular Immunology* **13**: 251–262.
- Kroismayr, A., Sehm, J., Pfaffl, M. W., Schedle, K., Plitzner, C. and Windisch, W.** 2008. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. *Czech Journal of Animal Science* **53**: 377–387.
- Kum, S., Eren, U., Onol, A. G. and Sandikci, M.** 2010. Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers. *Revue de Médecine Vétérinaire* **161**: 463–468.
- La-ongkhum, O., Pungsungvorn, N., Amornthewaphat, N. and Nitisinprasert, S.** 2011. Effect of the antibiotic avilamycin on the structure of the microbial community in the jejunal intestinal tract of broiler chickens. *Poultry Science* **90**: 1532–1538.
- Laxminarayan, R., Van Boeckel, T. and Teillant, A.** 2015. The economic costs of withdrawing antimicrobial growth promoters from the livestock. OECD Food, *Agriculture and Fisheries Papers*.doi.org/10.1787/5js64kst5wv1-
- Lee, K.-W., Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Jang, S. I. and Lee, S.-H.** 2014a. Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **200**: 76–85.
- Lee, K.-W., Li, G., Lillehoj, H. S., Lee, S.-H., Jang, S. I., Babu, U. S., Lillehoj, E. P., Neumann, A. P. and Siragusa, G. R.** 2011. *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens. *Research in Veterinary Science* **91**: e87–e91.
- Lee, K.-W., Lillehoj, H. S., Jang, S. I. and Lee, S.-H.** 2014b. Effects of salinomycin and *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses in broiler chickens. *Research in Veterinary Science* **97**: 304–308.
- Lee, K. W., Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Li, G. X., Jang, S. I., Babu, U. S., Park, M. S., Kim, D. K., Lillehoj, E. P., Neumann, A. P., Rehberger, T. G. and Siragusa, G. R.** 2010. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poultry Science* **89**: 203–216.
- Lee, S. H.** 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research* **13**: 11–8.
- Li, M., Gong, J., Cottrill, M., Yu, H., De Lange, C., Burton, J. and Topp, E.** 2003. Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 13–20.
- Li, Y., Zhang, H., Chen, Y. P., Yang, M. X., Zhang, L. L., Lu, Z. X., Zhou, Y. M. and Wang, T.** 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress and intestinal damage in lipopolysaccharide-challenged broilers. *Animal Feed Science and Technology* **208**: 119–131.
- Lin, J.** 2014. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Frontiers in Microbiology* **5**: 33.
- Liu, D., Guo, S. and Guo, Y.** 2012. Xylanase supplementation to a wheat-based diet alleviated



the intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged by *Clostridium perfringens*. *Avian Pathology* **41**: 291–298.

**Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V. and Gasbarrini, A.** 2013. Commensal clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens* **5**: 23. doi: 10.1186/1757-4749-5-23.

**Lowenthal, J. W., Bean, A. G. D. and Kogut, M. H.** 2013. What's so special about chicken immunology? *Developmental & Comparative Immunology* **41**: 307–309.

**Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J. and Lee, M. D.** 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6816–6824.

**Lu, Z., Ding, L., Lu, Q. and Chen, Y.-H.** 2013. Claudins in intestines. *Tissue Barriers* **1**: e24978.

**Mani-López, E., García, H. S. and López-Malo, A.** 2012. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International* **45**: 713–721.

**Marshall, B. M. and Levy, S. B.** 2011. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews* **24**: 718–733.

**Marshall, O. J.** 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* **20**: 2471–2472.

**Masooma S., Stringer, A. M. Bowen, J. M. and Gibson, R. J.** 2012. “Anti-inflammatory cytokines: Important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemotherapy Research and Practice* **2012**: 490804.

**Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M. and Bergaoui, R.** 2012. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *In vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science* **90**: 813–823.

**Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T. and Tanaka, R.** 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7220–7228.

**Mead, G. C.** 2005. Food safety control in the poultry industry (CRC Press).

**Miles, R. D., Butcher, G. D., Henry, P. R. and Littell, R. C.** 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poultry Science* **85**: 476–485.

**Min, Y. N., Yan, F., Liu, F. Z., Coto, C. and Waldroup, P. W.** 2009. Effect of various dietary enzymes on energy digestibility of diets high in distillers dried grains with solubles for broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* **18**: 734–740.

**Mohd Shaufi, M. A., Sieo, C. C., Chong, C. W., Gan, H. M. and Ho, Y. W.** 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathogens* **7**: 4. doi: 10.1186/s13099-015-0051-7

**Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N. and Ho, Y. W.** 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and

caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**: 341–348.

**Moon, N. J.** 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology* **55**: 453–460.

**Morales-López, R., Auclair, E., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., García, F. and Brufau, J.** 2010. Effects of different yeast cell wall supplements added to maize- or wheat-based diets for broiler chickens. *British Poultry Science* **51**: 399–408.

**Motoki, T., Kamisoyama, H., Honda, K. and Hasegawa, S.** 2011. Effect of dietary potassium diformate on the growth of growing broiler chickens. *The Journal of Poultry Science* **48**: 247–253.

**Mountzouris, K. C., Palamidi, I., Tsirtsikos, P., Mohnl, M., Schatzmayr, G. and Fegeros, K.** 2015. Effect of dietary inclusion level of a multi-species probiotic on broiler performance and two biomarkers of their caecal ecology. *Animal Production Science* **55**:484-493.

**Mountzouris, K.C., Palamidi, I., Paraskeuas, V., Griela, E., and Fegeros, K.** 2019. Dietary probiotic form modulates broiler gut microbiota indices and expression of gut barrier genes including essential components for gut homeostasis. submitted.

**Mountzouris, K. C., Paraskevas, V., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Steiner, T., Schatzmayr, G. and Fegeros, K.** 2011. Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Animal Feed Science and Technology* **168**: 223–231.

**Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G. and Fegeros, K.** 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science* **86**: 309–317.

**Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G. and Fegeros, K.** 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science* **89**: 58–67.

**Musa, H. H., Wu, S. L., Zhu, C. H., Seri, H. I. and Zhu, G. Q.** 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **8**: 313–321.

**Nava, G. M., Attene-Ramos, M. S., Gaskins, H. R. and Richards, J. D.** 2009. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Veterinary Microbiology* **137**: 345–353.

**Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M.G., Lee, W.Y., Kolegraff, K., Capaldo, C.T., Beeman, N., Addis, C., Gerner-Smidt, K., Neumaier, I., Skerra, A., Li, L., Parkos, C.A., Nusrat, A.** 2010. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity*. **32**: 392-402.

**Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J. and Knight, S. C.** 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**: 300–310.

**Niba, A. T., Beal, J. D., Kudi, A. C. and Brooks, P. H.** 2009. Bacterial fermentation in the

gastrointestinal tract of non-ruminants: Influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Tropical Animal Health and Production* **41**: 1393–1407.

**Niewold, T. A.** 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science* **86**: 605–609.

**Novick, D., Kim, S., Kaplanski, G., Dinarello, C.** 2013. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Seminars in Immunology*. **25**: 439-448

**O’Flaherty, S., Saulnier, D. M., Pot, B. and Versalovic, J.** 2010. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? *Gut Microbes* **1**: 293–300.

**O’Hara, A. M. and Shanahan, F.** 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* **7**: 688–693.

**Oakley, B. B. and Kogut, M. H.** 2016. Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. *Frontiers in Veterinary Science* **3**: 11. doi: 10.3389/fvets.2016.00011.

**Olsen, K. N., Henriksen, M., Bisgaard, M., Nielsen, O. L. and Christensen, H.** 2008. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 423–437.

**Olukosi, O. A. and Dono, N. D.** 2014. Modification of digesta pH and intestinal morphology with the use of benzoic acid or phytobiotics and the effects on broiler chicken growth performance and energy and nutrient utilization<sup>12</sup>. *Journal of Animal Science* **92**: 3945–3953.

**Osselaere, A., Santos, R., Hautekiet, V., De Backer, P., Chiers, K., Ducatelle, R. and Croubels, S.** 2013. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small intestine. *PloS One* **8**: e69014.

**Ouwehand, A. C., Tölkö, S., Kulmala, J., Salminen, S. and Salminen, E.** 2000. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* **31**: 82–86.

**Oviedo-Rondón, E. O.** 2009. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**: 209–225.

**Ozden, O., Black, B. L., Ashwell, C. M., Tipsmark, C. K., Borski, R. J. and Grubb, B. J.** 2010. Developmental profile of claudin-3,-5, and-16 proteins in the epithelium of chick intestine. *The Anatomical Record* **293**: 1175–1183.

**Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., and Kuby, J.** 2013. Kuby immunology. New York: W.H. Freeman.

**Palamidi, I. and Mountzouris, K. C.** 2018. Diet supplementation with an organic acids-based formulation affects gut microbiota and expression of gut barrier genes in broilers. *Animal Nutrition* **4**: 367-377. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.007>.

**Palamidi, I. Fegeros, K. Mohnl, M. Abdelrahman, W. H. A., Schatzmayr, G. Theodoropoulos, G. and Mountzouris K. C.** 2016b. Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. *Poultry Science* **7**:1598–1608. <https://doi.org/10.3382/ps/pew052>.

**Palamidi, I., Paraskeuas, V., Theodorou, G., Breitsma, R. and Mountzouris, K. C.** 2016a.

Effects of dietary acidifier supplementation on broiler growth performance, digestive and immune function indices. *Animal Production Science* **57**:271–281.

**Pan, D. and Yu, Z.** 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* **5**: 108–119.

**Panda, A. K., Rao, S. V. R., Raju, M. V. L. N. and Sunder, G. S.** 2009. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **22**: 1026–1031.

**Papatsiros, V. G., Christodoulopoulos, G. and Filippopoulos, L. C.** 2012. The use of organic acids in monogastric animals (swine and rabbits). *Journal of Cell and Animal Biology* **6**: 154–159.

**Paradis, M. A., McMillan, E., Bagg, R., Vessie, G., Zocche, A. and Thompson, M.** 2016. Efficacy of avilamycin for the prevention of necrotic enteritis caused by a pathogenic strain of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Pathology* **45**: 365–369.

**Park, J.-H., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., Murata, Y. and Matozaki, T.** 2016. Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: role of short-chain fatty acids. *PloS One* **11**: e0156334.

**Patterson, J. and Burkholder, K.** 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science* **82**: 627–631.

**Paul, G., Khare, V. and Gasche, C.** 2012. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *European Journal of Clinical Investigation* **42**: 95–109.

**St. Paul, M., Brisbin, J. T., Abdul-Careem, M. F. and Sharif, S.** 2013. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **152**: 191–199.

**Paul, S. K., Halder, G., Mondal, M. K. and Samanta, G.** 2007. Effect of Organic Acid Salt on the Performance and Gut Health of Broiler Chicken. *The Journal of Poultry Science* **44**: 389–395.

**Peinado, M. J., Ruiz, R., Echávarri, A., Aranda-Olmedo, I. and Rubio, L. A.** 2013. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **181**: 87–92.

**Pender, C. M., Kim, S., Potter, T. D., Ritzi, M. M., Young, M. and Dalloul, R. A.** 2016. *In ovo* supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. *Poultry Science* **96**: 1052–1062.

**Peng, Q., Zeng, X. F., Zhu, J. L., Wang, S., Liu, X. T., Hou, C. L., Thacker, P. A. and Qiao, S. Y.** 2016. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* B1 on growth performance, intestinal microbiota, and short chain fatty acid profiles in broiler chickens. *Poultry Science* **95**: 893–900.

**Pereira, R., Menten, J. F. M., Bortoluzzi, C., Napty, G. S., Longo, F. A., Vittori, J., Lourenço, M. C. and Santin, E.** 2015. Organic acid blend in diets of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *The Journal of Applied Poultry Research* **24**: 387–393.

**Perez, R. H., Zendo, T. and Sonomoto, K.** 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria

(LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories* **13 Suppl 1**: S3.

**Perić, L., Milošević, N., Žikić, D., Bjedov, S., Cvetković, D., Markov, S., Mohnl, M. and Steiner, T.** 2010. Effects of probiotic and phytogetic products on performance, gut morphology and cecal microflora of broiler chickens. *Archiv fur Tierzucht* **53**: 350–359.

**Perry, G. C., Editor.** 2006. Avian gut function in health and disease (Wallingford, CABI).

**Pirgozliev, V., Murphy, T. C., Owens, B., George, J. and McCann, M. E. E.** 2008. Fumaric and sorbic acid as additives in broiler feed. *Research in Veterinary Science* **84**: 387–394.

**Polycarpo, G. V., Andretta, I., Kipper, M., Cruz-Polycarpo, V. C., Dadalt, J. C., Rodrigues, P. H. M. and Albuquerque, R.** 2017. Meta-analytic study of organic acids as an alternative performance-enhancing feed additive to antibiotics for broiler chickens. *Poultry Science* **96**: 3645–3653.

**Pourabedin, M., Guan, L. and Zhao, X.** 2015. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome* **3**: 15.

**Quinteiro-Filho, W. M., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M. L., Sakai, M., Sa, L. R. M., Ferreira, A. J. P. and Palermo-Neto, J.** 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science* **89**: 1905–1914.

**Ragaa, N. M. and Korany, R. M. S.** 2016. Studying the effect of formic acid and potassium diformate on performance, immunity and gut health of broiler chickens. *Animal Nutrition* **2**: 296–302.

**Rahman, M. M. and Eo, S. K.** 2012. Prospects and challenges of using chicken cytokines in disease prevention. *Vaccine* **30**: 7165–7173.

**Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., Yu, D. Y. and Li, W. F.** 2013. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science* **92**: 956–965.

**Ranjitkar, S., Lawley, B., Tannock, G. and Engberg, R. M.** 2016. Bacterial succession in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* **82**: 2399–2410.

**Rehman, H. U., Vahjen, W., Awad, W. A. and Zentek, J.** 2007. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition* **61**: 319–335.

**Reid, W. D. K., Close, A. J., Humphrey, S., Chaloner, G., Lacharme-Lora, L., Rothwell, L., Kaiser, P., Williams, N. J., Humphrey, T. J., Wigley, P. and Rushton, S. P.** 2016. Cytokine responses in birds challenged with the human food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* implies a Th17 response. *Royal Society Open Science* **3**: 150541.

**Ricke, S.** 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science* **82**: 632–639.

**Rinttila, T. and Apajalahti, J.** 2013. Intestinal microbiota and metabolites--Implications for broiler chicken health and performance<sup>1</sup>. *The Journal of Applied Poultry Research* **22**: 647–658.

**Rodríguez, M. L., Rebolé, A., Velasco, S., Ortiz, L. T., Treviño, J. and Alzueta, C.** 2012. Wheat- and barley-based diets with or without additives influence broiler chicken performance, nutrient digestibility and intestinal microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**: 184–190.

**Runho, R. C., Sakomura, N. K., Kuana, S., Banzatto, D., Junqueira, O. M. and Stringhini, J. H.** 1997. Use of an organic acid (fumaric acid) in broiler rations. *Revista Brasileira de Zootecnia* **26**: 1183–1191.

**Sakai, Y., Tsukahara, T., Bukawa, W., Matsubara, N. and Ushida, K.** 2006. Cell preparation of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 Prevents vancomycin-resistant enterococci colonization in the cecum of newly hatched chicks. *Poultry Science* **85**: 273–277.

**Salminen, S. and Wright, A. von.** 2004. Lactic acid bacteria (CRC Press).

**Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C. and Hardt, P. D.** 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* **18**: 190–195.

**Sen, S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, J. S., Kim, K. H., Lohakare, J. D., Kim, E. K., Kim, H. S., Ryu, M. H., Kwon, I. K. and Chae, B. J.** 2012. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science* **93**: 264–268.

**Senkoylu, N., Samli, H., Kanter, M. and Agma, A.** 2007. Influence of a combination of formic and propionic acids added to wheat- and barley-based diets on the performance and gut histomorphology of broiler chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* **55**: 479–490.

**Setta, A.M., Barrow, P.A., Kaiser, P. and Jones M.A.** 2012. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **35**: 397-410

**Shao, Y., Guo, Y. and Wang, Z.** 2013. -1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Poultry Science* **92**: 1764–1773.

**Shaw, A. L., Blake, J. P. and Gordon, R. W.** 2010. Evaluation of commercial phytase enzymes on performance and tibia-breaking strength of male broiler chicks. *The Journal of Applied Poultry Research* **19**: 415–421.

**Shibolet, O. and Podolsky, D. K.** 2007. TLRs in the Gut.IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **292**: G1469–G1473.

**Shim, Y. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Seo, D. K., Lee, S. C., Chae, B. J. and Kwon, I. K.** 2012. A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science* **53**: 482–490.

**Shouval, D. S., Ouahed, J., Biswas, A., Goettel, J. A., Horwitz, B. H., Klein, C., Muise, A. M., Snapper, S. B.** 2014. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Advances in Immunology*. **122**: 177-210.

**Shin, M. S., Han, S. K., Ji, A. R., Kim, K. S. and Lee, W. K.** 2008. Isolation and

characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 2203–2212.

**Siegmund, B.** 2010. Interleukin-18 in Intestinal Inflammation: Friend and Foe? *Immunity* **32**: 300–302.

**Sikandar, A., Zaneb, H., Younus, M., Masood, S., Aslam, A., Khattak, F., Ashraf, S., Yousaf, M. S. and Rehman, H.** 2017. Effect of sodium butyrate on performance, immune status, microarchitecture of small intestinal mucosa and lymphoid organs in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **30**: 690–699.

**Silkie, S. S. and Nelson, K. L.** 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. *Water Research* **43**: 4860–4871.

**Silva, V. K., Da Silva, J. D. T., Torres, K. A. A., De Faria Filho, D. E., Hada, F. H. and De Moraes, V. M. B.** 2009. Humoral immune response of broilers fed diets containing yeast extract and prebiotics in the prestarter phase and raised at different temperatures. *The Journal of Applied Poultry Research* **18**: 530–540.

**Smirnov, A., Perez, R., Amit-Romach, E., Sklan, D. and Uni, Z.** 2005. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *The Journal of Nutrition* **135**: 187–192.

**Smulikowska, S., Czerwiński, J., Mieczkowska, A. and Jankowiak, J.** 2009. The effect of fat-coated organic acid salts and a feed enzyme on growth performance, nutrient utilization, microflora activity, and morphology of the small intestine in broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* **18**: 478–489.

**Song, J., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H., Diao, Q. Y., Shi, B. and Zou, X. T.** 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science* **93**: 581–588.

**Stanley, D., Denman, S. E., Hughes, R. J., Geier, M. S., Crowley, T. M., Chen, H., Haring, V. R. and Moore, R. J.** 2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 1361–1369.

**Stanley, D., Geier, M. S., Chen, H., Hughes, R. J. and Moore, R. J.** 2015. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiology* **15**: 51.

**Stanley, D., Hughes, R. J., Geier, M. S. and Moore, R. J.** 2016. Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: Challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* **7**: 187.

**Stanley, D., Hughes, R. J. and Moore, R. J.** 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 4301–4310.

**Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E. and Seal, B. S.** 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and*

*Chemotherapy* **50**: 3111–3116.

**Sugiharto, S.** 2016. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **15**: 99–111.

**Suiryanrayna, M. V. A. N. and Ramana, J. V.** 2015. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **6**: 45.

**Sun, H., Tang, J. W., Fang, C. L., Yao, X. H., Wu, Y. F., Wang, X. and Feng, J.** 2013. Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal. *Poultry Science* **92**: 392–401.

**Suresh, G., Das, R. K., Kaur Brar, S., Rouissi, T., Avalos Ramirez, A., Chorfi, Y. and Godbout, S.** 2018. Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. *Critical Reviews in Microbiology* **44**: 318–335.

**Suzuki, T.** 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**: 631–659.

**Swaggerty, C. L., Pevzner, I. Y., Kaiser, P. and Kogut, M. H.** 2008. Profiling pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA expression levels as a novel method for selection of increased innate immune responsiveness. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **126**: 35–42.

**Takaki, H., Minoda, Y., Koga, K., Takaesu, G., Yoshimura, A. and Kobayashi, T.** 2006. TGF- $\beta$ 1 suppresses IFN- $\gamma$ -induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes to Cells* **11**: 871–882.

**Tanikawa, T., Shoji, N., Sonohara, N., Saito, S., Shimura, Y., Fukushima, J. and Inamoto, T.** 2011. Aging transition of the bacterial community structure in the chick ceca. *Poultry Science* **90**: 1004–1008.

**Tash, B. R., Bewley, M. C., Russo, M., Keil, J. M., Griffin, K. A., Sundstrom, J. M., Antonetti, D. A., Tian, F. and Flanagan, J. M.** 2012. The occludin and ZO-1 complex, defined by small angle X-ray scattering and NMR, has implications for modulating tight junction permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 10855–10860.

**Taverniti, V. and Guglielmetti, S.** 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition* **6**: 261–274.

**Tellez, G., Higgins, S. E., Donoghue, A. M. and Hargis, B. M.** 2006. Digestive physiology and the role of microorganisms. *The Journal of Applied Poultry Research* **15**: 136–144.

**Thanh, N. T., Loh, T. C., Foo, H. L., Hair-bejo, M. and Azhar, B. K.** 2009. Effects of feeding metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faecal microbial population, small intestine villus height and faecal volatile fatty acids in broilers. *British Poultry Science* **50**: 298–306.

**Thompson, C. L., Wang, B. and Holmes, A. J.** 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *The ISME Journal* **2**: 739–748.

**Tillman, G. E., Haas, G. J., Wise, M. G., Oakley, B., Smith, M. A. and Siragusa, G. R.**



2011. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FEMS Microbiology Ecology* **77**: 395–403.
- Tsirtsikos, P., Fegeros, K., Balaskas, C., Kominakis, A. and Mountzouris, K. C.** 2012. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. *Poultry Science* **91**: 1860–1868.
- Varasteh, S., Braber, S., Akbari, P., Garssen, J. and Fink-Gremmels, J.** 2015. Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galacto-oligosaccharides. *PLoS One* **10**: e0138975.
- Villena, J. and Kitazawa, H.** 2014. Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Frontiers in Immunology* **4**: 512.
- Waititu, S. M., Yitbarek, A., Matini, E., Echeverry, H., Kiarie, E., Rodriguez-Lecompte, J. C. and Nyachoti, C. M.** 2014. Effect of supplementing direct-fed microbials on broiler performance, nutrient digestibilities, and immune responses<sup>1</sup>. *Poultry Science* **93**: 625–635.
- Walter, J.** 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4985–4996.
- Wang, C., Li, X., Zhang, C., Wu, T., Li, Y. and Cheng, X.** 2015. A eukaryotic expression plasmid carrying chicken interleukin-18 enhances the response to newcastle disease virus vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology* **22**: 56–64.
- Wang, J., Fan, H., Han, Y., Wei, J., Zhao, J. and Zhou, Z.** 2016a. Pyrosequencing of the broiler chicken gastrointestinal tract reveals the regional similarity and dissimilarity of microbial community. *Canadian Journal of Animal Science* **97**: 302–313.
- Wang, L., Li, L., Lv, Y., Chen, Q., Feng, J. and Zhao, X.** 2018. *Lactobacillus plantarum* restores intestinal permeability disrupted by salmonella infection in newly-hatched chicks. *Scientific Reports* **8**: 2229.
- Wang, X., Farnell, Y. Z., Peebles, E. D., Kiess, A. S., Wamsley, K. G. S. and Zhai, W.** 2016b. Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. *Poultry Science* **95**: 1332–1340.
- Wang, Y., Sun, J., Zhong, H., Li, N., Xu, H., Zhu, Q. and Liu, Y.** 2017. Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken. *Scientific Reports* **7**: 6400.
- Wealleans, A. L., Sirukhi, M. and Egorov, I. A.** 2017. Performance, gut morphology and microbiology effects of a *Bacillus* probiotic, avilamycin and their combination in mixed grain broiler diets. *British Poultry Science* **58**: 523–529.
- Weber, C. R., Nalle, S. C., Tretiakova, M., Rubin, D. T. and Turner, J. R.** 2008. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Laboratory Investigation* **88**: 1110–1120.
- Wells, J. M., Brummer, R. J., Derrien, M., MacDonald, T. T., Troost, F., Cani, P. D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., De Vos, W. M., Mercenier, A., Nauta, A. and Garcia-Rodenas, C. L.** 2017. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers.

*American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **312**: G171–G193.

**Wen, K., Li, G., Bui, T., Liu, F., Li, Y., Kocher, J., Lin, L., Yang, X. and Yuan, L.** 2012. High dose and low dose *Lactobacillus acidophilus* exerted differential immune modulating effects on T cell immune responses induced by an oral human rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine* **30**: 1198–1207.

**Werling, D. and Jungi, T. W.** 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **91**: 1–12.

**Van Der Wielen, P. W., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B. A. and Van Knapen, F.** 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2536–2540.

**Wigley, P.** 2014. *Salmonella enterica* in the chicken: how it has helped our understanding of immunology in a non-biomedical model species. *Frontiers in Immunology* **5**: 482.

**Wigley, P. and Kaiser, P.** 2003. Avian cytokines in health and disease. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* **5**: 1–14.

**Wise, M. G. and Siragusa, G. R.** 2006. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 1138–1149.

**Witzig, M., Carminha-Silva, A., Camarinha da Silva, A., Green-Engert, R., Hoelzle, K., Zeller, E., Seifert, J., Hoelzle, L. E. and Rodehutschord, M.** 2015. Spatial variation of the gut microbiota in broiler chickens as affected by dietary available phosphorus and assessed by T-RFLP analysis and 454 pyrosequencing. *PLoS One* **10**: e0143442.

**Wu, Z., Hu, T., Rothwell, L., Vervelde, L., Kaiser, P., Boulton, K., Nolan, M. J., Tomley, F. M., Blake, D. P. and Hume, D. A.** 2016. Analysis of the function of IL-10 in chickens using specific neutralising antibodies and a sensitive capture ELISA. *Developmental & Comparative Immunology* **63**: 206–212.

**Xiao, Y., Xiang, Y., Zhou, W., Chen, J., Li, K. and Yang, H.** 2016. Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poultry Science* **96**: 1387–1393.

**Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T. and Fang, J.-Y.** 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* **5**: 241.

**Yang, X. J., Li, W. L., Feng, Y. and Yao, J. H.** 2011. Effects of immune stress on growth performance, immunity, and cecal microflora in chickens. *Poultry Science* **90**: 2740–2746.

**Yegani, M. and Korver, D. R.** 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science* **87**: 2052–2063.

**Yeoman, C. J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N. D. and White, B. A.** 2012. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews* **13**: 89–99.

**Yin, Y., Lei, F., Zhu, L., Li, S., Wu, Z., Zhang, R., Gao, G. F., Zhu, B. and Wang, X.** 2010. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *The ISME Journal* **4**: 367–376.

**Ziprin, R., Beier, R., Pillai, S. and Phillips, T.** 2004. Preharvest and Postharvest Food Safety:

Contemporary Issues and Future Directions.

**Zhang, B., Shao, Y., Liu, D., Yin, P., Guo, Y. and Yuan, J.** 2012a. Zinc prevents *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced loss of intestinal mucosal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathology* **41**: 361–367.

**Zhang, G. and Ghosh, S.** 2001. Toll-like receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *Journal of Clinical Investigation* **107**: 13–19.

**Zhang, G. and Sunkara, L.** 2014. Avian antimicrobial host defense peptides: from biology to therapeutic applications. *Pharmaceuticals* **7**: 220–247.

**Zhang, J. L., Xie, Q. M., Ji, J., Yang, W. H., Wu, Y. B., Li, C., Ma, J. Y. and Bi, Y. Z.** 2012b. Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens. *Poultry Science* **91**: 2755–2760.

**Zhang, Z. F. and Kim, I. H.** 2014. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry Science* **93**: 364–370.

**Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y. and Joerger, R. D.** 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 124–137.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### *Βιογραφικό σημείωμα*

#### **Προσωπικές πληροφορίες**

Παλαμίδα Ιριδα

irispalamidi@gmail.com

#### **Εκπαίδευση**

Φεβ 12–Παρόν

Διδακτορικός Τίτλος Σπουδών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Οκτ 09–Σεπ 11

Μεταπτυχιακό (MSc) Διατροφή Αγροτικών Ζώων και Τεχνολογία Ζωοτροφών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σεπ 01–Μαρτ 09

Πτυχίο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (Ελλάδα)

#### **Δημοσιεύσεις προερχόμενες από τη διδακτορική διατριβή**

**Palamidi, I.,** V. Paraskeuas, G. Theodorou, R. Breitsma, G. Schtzmayr, G. Theodoropoulos, K. Fegeros and K.C. Mountzouris (2016) Effects of dietary acidifier supplementation on broiler growth performance, digestive and immune function indices. *Animal Production Science* 57: 271-281

**Palamidi, I.,** K. Fegeros, M. Mohnl, W. H. A. Abdelrahman, G. Schatzmayr, G. Theodoropoulos, and K. C. Mountzouris (2016) Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. *Poultry Science* 0: 1–11.

**Palamidi I.** and K.C. Mountzouris (2018) Dietary acidifier inclusion affects gut microbiota and expression of gut barrier genes in broilers *Animal Nutrition*. 4: 367-377

Mountzouris, K.C., **Palamidi, I.**, Paraskeuas, V., Griela, E., and Fegeros, K. 2019. Dietary probiotic form modulates broiler gut microbiota indices and expression of gut barrier genes including essential components for gut homeostasis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. submitted.

#### Άλλες δημοσιεύσεις

Mountzouris, KC, Tsirtsikos P, **Palamidi I**, Arvaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G and Fegeros K (2010) Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance nutrient digestibility, plasma immunoglobulins and cecal microflora composition. *Poultry Science* 89: 58-67.

Mountzouris, KC, Paraskevas V, Tsirtsikos P, **Palamidi I**, Steiner T, Schatzmayr G and Fegeros K (2011) Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Animal Feed Science and Technology* 168: 223-231.

Mountzouris, KC, **Palamidi I**, Tsirtsikos P, Mohnl M, Schatzmayr G and Fegeros K (2014) Effect of dietary inclusion level of a multi-species probiotic on broiler performance and two biomarkers of their caecal ecology. *Animal Production Science*: <http://dx.doi.org/10.1071/AN13358>

Mountzouris, K, Dalaka E. **Palamidi I**, Paraskeuas B, Demey V, Theodoropoulos G, Fegeros K. (2015) Evaluation of yeast dietary supplementation in broilers challenged or not with Salmonella on growth performance, cecal microbiota composition and Salmonella in ceca, cloacae and carcass skin. *Poultry Science* 94: 2445–2455.

Paraskeuas, V., K. Fegeros, **I. Palamidi**, G. Theodoropoulos, K. C. Mountzouris (2016) Phytogenic Administration and Reduction of Dietary Energy and Protein Levels Affects Growth Performance, Nutrient Digestibility and Antioxidant Status of Broilers. *The Journal of Poultry Science* 53: 264-273.

Paraskeuas, V., K. Fegeros, I. Palamidi, C. Hunger, K. C. Mountzouris (2017) Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different phytogenic levels *Animal Nutrition* 3: 114-120.

**Παρουσιάσεις  
προερχόμενες από τη  
διδακτορική διατριβή**

Mountzouris K, Palamidi I, Paraskevas V, Urbaityte R, Pasteiner S, Fegeros K. Influence of an acidifier administration in diets supplemented or not with an antimicrobial growth promoter on broiler performance. *International Poultry Scientific Forum*, Ιανουάριος 2013.

Παλαμίδα Ι, Παρασκευάς Β, Φεγγερός Κ, Μουντζούρης Κ. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή και αντιμικροβιακού αυξητικού παράγοντα στο σιτηρέσιο, στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και την πεπτικότητα της τροφής σε ορνίθια κρεοπαραγωγής. Ετήσιο Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας, Οκτώβριος 2013.

Παλαμίδα Ι, Φεγγερός Κ, Μουντζούρης Κ. Διερεύνηση της επίδρασης προσθήκης στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγής ορνιθίων ενός οξινιστή και ενός αντιμικροβιακού αυξητικού παράγοντα επί της γονιδιακής έκφρασης επιλεγμένων κυτταροκινών. Ετήσιο Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας, Οκτώβριος 2014.

**Άλλες παρουσιάσεις**

Μουντζούρης Κ, Τσιρτσίκος Π, Παλαμίδα Ι, Φεγγερός Κ. Επίδραση του επιπέδου προσθήκης ενός προβιοτικού στην διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγικού τύπου. Ετήσιο Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας, Οκτώβριος 2009.

Mountzouris K, Tsirtsikos P, Palamidi I, Fegeros K. Evaluation of the efficacy of sequential administration of probiotics and phytogenics or their throughout combination in broiler nutrition. *World Nutrition Forum* Οκτώβριος 2010.

Weiland T, Mountzouris K, Paraskevas V, Palamidi I, Steiner T, Fegeros K. Effects of dietary energy and protein levels and supplementation with essential oils on growth performance of broilers. International Poultry Scientific Forum, Ιανουάριος 2013.

Παρασκευάς Β, Παλαμίδη Ι, Φεγγερός Κ, Μουντζούρης Κ. Επίδραση της προσθήκης αιθερίων ελαίων σε σιτηρέσια με διαφορετικά επίπεδα ενέργειας και πρωτεϊνών επί της ανάπτυξης κρεοπαραγωγικών ορνιθίων και πεπτικότητας. Ετήσιο Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας, Οκτώβριος 2013.

**Συμμετοχή σε  
ερευνητικά  
προγράμματα**

01/06/2009-31/07/2009. Διερεύνηση της βέλτιστης συγκέντρωσης χρησιμοποίησης ενός προβιοτικού και ενός φυτικού προϊόντος.

03/09/2012-30/04/2013 και 01/11/2013-31/10/2014. Διερεύνηση κρίσιμων βιοδεικτών που υποστηρίζουν πιθανούς μηχανισμούς για την ευεργετική επίδραση των προβιοτικών και των φυτικών πρόσθετων υλών στις αποδόσεις και στην εντερική υγεία κρεοπαραγωγών ορνιθίων

17/12/2012-31/05/2013. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας χρησιμοποίησης της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στη διατροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων υπό συνθήκες πειραματικής μόλυνσης

15/11/2015-29/02/2016. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογής των θρεπτικών ισοδύναμων (Matrix Values) επιλεγμένων ενζύμων στην διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής

04/01/2016-30/06/2016. Χαρτογράφηση και επιβεβαίωση των ισοδύναμων σε ενέργεια και πρωτεΐνη μιγμάτων φυτικών

εκχυλισμάτων και προβιοτικών για την επίτευξη βέλτιστων αποδόσεων σε παχυνόμενα ορνίθια.

02/2018-Παρόν. Γονιδιωματική σάρωση, εντοπισμός και ανάλυση ρόλου γονιδίων σχετιζόμενων με το σωματικό βάρος στο είδος *Gallus gallus*