



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΦΥΤΟΓΕΝΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΗΣ
ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Β. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΟΥΝΤΖΟΥΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΦΥΤΟΓΕΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ

NUTRITIONAL EFFECTS FOLLOWING PHYTOGENIC ADDITION ON THE IMPRINT OF GUT ECOLOGY PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF BROILER CHICKENS

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Β. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΟΥΝΤΖΟΥΡΗΣ

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μουντζούρης Κ (Αν.Καθηγητής)

Οικονομόπουλος Ι. (Αν.Καθηγητής)

Πολίτης Ι. (Καθηγητής)

Επταμελή Επιτροπή:

Μουντζούρης Κ (Αν.Καθηγητής)

Οικονομόπουλος Ι. (Αν.Καθηγητής)

Πολίτης Ι. (Καθηγητής)

Παπάς Αθανάσιος (Επ. Καθηγητής)

Φεγγερός Κωνσταντίνος (Καθηγητής)

Ευτέρπη Χρηστάκη-Σαδικάκη (Καθηγήτρια)

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΦΥΤΟΓΕΝΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΗΣ
ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ**

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

*Τμήμα Επιστήμης της Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο
Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε σε βάθος η επίδραση της προσθήκης φυτοβιοτικών πρόσθετων υλών σε συνδυασμό με τον τύπο του σιτηρεσίου κρεοπαραγωγών ορνιθίων επί των παραγωγικών αποδόσεων και παραμέτρων της εντερικής υγείας και λειτουργίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά τυποποιημένα φυτοβιοτικά ΦΣ1 (μίγμα φυτογενών συστατικών βασισμένο σε αιθέρια έλαια ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών) και ΦΣ2 (μίγμα φυτογενών συστατικών με κύρια συστατικά μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη) τα οποία εξετάσθηκαν σε συνδυασμό ή μη με τα επίπεδα (συγκεντρώσεις) ενέργειας (ΜΕ) και πρωτεΐνης (ΟΠ) του σιτηρεσίου ή με το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού (αραβόσιτος ή σιτάρι). Πραγματοποιήθηκε ο αναλυτικός προσδιορισμός σειράς σημαντικών παραγωγικών, βιοχημικών και μοριακών δεικτών όπως της αύξησης του σωματικού βάρους, της κατανάλωσης της τροφής, του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής, της θνησιμότητας, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος και του κρέατος, καθώς και άλλων βιοχημικών δεικτών. Ακόμα προσδιορίστηκαν η σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας και η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εντερική υγεία και ακεραιότητα. Οι παραπάνω αναλυτικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο πέντε μελετών που αποτέλεσαν και ανεξάρτητα κεφάλαια της παρούσας διατριβής.

Αναλυτικά στην πρώτη και την τέταρτη μελέτη εξετάσθηκε η επίδραση του ΦΣ1 σε συνδυασμό ή μη με την ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ. Ο τύπος σιτηρεσίου Α χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και καταρτίστηκε με βάση τις προδιαγραφές της Cobb για μέγιστη απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Οι τύποι σιτηρεσίου Β και C, καταρτίστηκαν με ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ κατά 3% και 6% αντίστοιχα και σε σύγκριση με τον τύπο σιτηρεσίου Α. Ο λόγος ΜΕ:ΟΠ διατηρήθηκε σταθερός σε όλους τους τύπους των σιτηρεσίων (Α, Β, C). Πραγματοποιήθηκε προσθήκη ή μη

ΦΣ1 σε συγκέντρωση 125 mg/kg σιτηρεσίου, χρησιμοποιήθηκαν 450 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb μιας ημέρας και το πείραμα ήταν διάρκειας 42 ημερών. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στις 2 παραπάνω μελέτες έγινε με το γενικό γραμμικό μοντέλο, με παράγοντες τον τύπο (ΤΣ) του σιτηρεσίου (Α, Β και C) και την προσθήκη του ΦΣ1 (0 και 125 mg/kg). Διαπιστώθηκε ότι ενώ η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ), κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης ($P_{ΤΣ}=0.021$) και κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος ($P=0.010$), η προσθήκη ΦΣ1 παρουσίασε τάση βελτίωσης του ΣΕΤ κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης ($P_{ΦΣ1}=0.090$), της φάσης ανάπτυξης ($P_{ΦΣ1}=0.057$) αλλά και καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ($P=0.089$). Επίσης, η προσθήκη ΦΣ1 ελάττωσε ($P_{ΦΣ1}=0.002$) τη χοληστερόλη και αύξησε ($P_{ΦΣ1}<0.001$) την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος, ενώ ταυτόχρονα αύξησε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο στήθος ($P_{ΦΣ1}<0.001$) και στο μηρό ($P_{ΦΣ1}=0.010$) των ορνιθίων. Τέλος, η προσθήκη ΦΣ1 άσκησε ευεργετική επίδραση επί της συγκέντρωσης ωφέλιμων πληθυσμών βακτηρίων στο επιθήλιο του τυφλού εντέρου, όπως οι *Bacteroides* spp ($P_{ΦΣ1}=0.031$), *Clostridium* cluster IV ($P_{ΦΣ1}=0.007$) και *Clostridium* cluster XIVa ($P_{ΦΣ1}=0.039$), επί της έκφρασης των Toll-like υποδοχέων TLR2 στο επιθήλιο του ειλεού ($P_{ΦΣ1}=0.021$) και των τυφλών εντέρων ($P_{ΦΣ1}<0.001$), καθώς επίσης και των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου zonula οκλουδίνης 2 (ZO-2) ($P_{ΦΣ1}=0.031$) στο επιθήλιο του ειλεού και ZO-2 ($P_{ΦΣ1}=0.009$), κλαουδίνης 5 (CLDN5) ($P_{ΦΣ1}=0.005$) και οκλουδίνης (OCLN) ($P_{ΦΣ1}=0.039$) στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα, παρέχουν ενδείξεις για τους τρόπους δράσης των φυτοβιοτικών στον οργανισμό των ορνιθίων και επιπρόσθετα υποστηρίζουν περαιτέρω την ευεργετική του επίδραση επί των των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων.

Η προσθήκη ΦΣ2 εξετάσθηκε στο πλαίσιο τριών μελετών (π.χ. 2^η, 3^η και 5^η). Πιο συγκεκριμένα στη δεύτερη μελέτη και την τρίτη μελέτη εξετάσθηκαν οι επιδράσεις των επιπέδων (συγκεντρώσεων) προσθήκης του ΦΣ2 με χορήγηση βασικού σιτηρεσίου αραβοσίτου-σογιάλεου (2^η μελέτη) και σιταριού-σογιάλεου (3^η μελέτη). Για την πραγματοποίηση καθεμίας εκ των δύο μελετών χρησιμοποιήθηκαν 225 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν έγινε με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και η γραμμική και τετραγωνική επίδραση των επιπέδων προσθήκης του

ΦΣ2 με τη μέθοδο πολυωνυμικών συγκρίσεων. Στη δεύτερη μελέτη παρατηρήθηκε τετραγωνική επίδραση επί του ΣΕΤ ($P=0.009$) στην τελική φάση πάχυνσης και συνολικά γραμμικό ($P=0.018$) και τετραγωνικό ($P=0.016$) μοτίβο αύξησης στο ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ) των ορνιθίων με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2. Επιπρόσθετα, με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2, η ολική φαινομένη πεπτικότητα της ξηράς ουσίας παρουσίασε γραμμικό ($P=0.001$) και τετραγωνικό ($P=0.023$) μοτίβο αύξησης ενώ γραμμικό μοτίβο ($P=0.005$) αύξησης παρατηρήθηκε και για τον συντελεστή φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένο κατά το άζωτο (AME_N). Τέλος, αυξανόμενων των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος παρουσίασε γραμμικό μοτίβο αύξησης ($P=0.031$). Συνολικά στη δεύτερη μελέτη, διαπιστώθηκε ο ωφέλιμος ρόλος του ΦΣ2 ως φυσικού αυξητικού παράγοντα και παράγοντα υγείας σε ορνίθια κρεοπαραγωγής στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο.

Στην τρίτη μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα, την εμφάνιση γραμμικού μοτίβου αύξησης ($P = 0.044$) για το ΡΑΣΒ στην τελική φάση πάχυνσης, τετραγωνικού μοτίβου μείωσης ($P = 0.035$) για την κατανάλωσης της τροφής (ΚΤ) και τετραγωνικού μοτίβου ελάττωσης ($P = 0.024$) για το ΣΕΤ συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπρόσθετα, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2, προκάλεσε την εμφάνιση γραμμικού μοτίβου αύξησης ($P = 0.001$) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς επίσης και γραμμικού μοτίβου μείωσης ($P = 0.005$) της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων και γραμμικού μοτίβου μείωσης ($P=0.016$) της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο κρέας (μηρό). Συμπερασματικά, η προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg / kg σιτηρεσίου άσκησε ευεργετική επίδραση επί της παραγωγικής απόδοσης των ορνιθίων ενώ άσκησε ισχυρότερη ευεργετική επίδραση στη συγκέντρωση των 150 mg / kg επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος καθώς επίσης και της συγκέντρωσης χοληστερόλης στο κρέας των ορνιθίων.

Τέλος, στην πέμπτη μελέτη διερευνήθηκαν οι επιδράσεις των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 ως προς το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού που ήταν αραβόσιτος (Α) ή σιτάρι (Σ) επί των εξεταζόμενων παραμέτρων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα 450 ορνίθια κρεοπαραγωγής της δεύτερης και τρίτης μελέτης και η στατιστική ανάλυση έγινε με το γενικό γραμμικό μοντέλο -γενική παραγοντική

ανάλυση ANOVA, με παράγοντες το είδος του δημητριακού καρπού (ΔΚ) και των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 (0, 100 και 150 mg/kg σιτηρεσίου). Σημαντικές αλληλεπιδράσεις ($P \leq 0.05$) μεταξύ του είδους του χρησιμοποιούμενου δημητριακού καρπού και των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 παρουσιάστηκαν για τους πληθυσμούς των βακτηρίων *Bacteroides* και *Clostridium* cluster XIVa στο εντερικό περιεχόμενο των τυφλών εντέρων. Η χρησιμοποίηση σιταριού στα σιτηρέσια των ορνιθίων προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων *Lactobacillus* ($P_{\Delta K} = 0.007$) στο επιθήλιο και των *Bifidobacterium* ($P_{\Delta K} < 0.001$) στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων καθώς επίσης και ελάττωση των επιπέδων των πληθυσμών των συνολικών βακτηρίων ($P_{\Delta K} = 0.004$) και των υποομάδων του γένους *Clostridia* I, IV και XIVa ($P_{\Delta K} \leq 0.05$) στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων. Επιπρόσθετα, προκάλεσε σημαντική ($P \leq 0.05$) αύξηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της ZO-2 στο επιθήλιο του ειλεού καθώς επίσης και σημαντική ελάττωση της έκφρασης του TLR2 στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές για τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο με βασικό δημητριακό καρπό τον αραβόσιτο. Αναφορικά με τις επιδράσεις των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2, η προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg / kg προκάλεσε αύξηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της CLDN5 ($P_{\Phi\Sigma 2} = 0.023$) και της MUC2 ($P_{\Phi\Sigma 2} = 0.001$) στο επιθήλιο του ειλεού καθώς επίσης η προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg / kg προκάλεσε ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα TLR2 ($P_{\Phi\Sigma 2} = 0.022$) στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, συγκριτικά με τις επεμβάσεις στις οποίες δε χορηγήθηκε το ΦΣ2. Τα αποτελέσματα της πέμπτης μελέτης έδειξαν ότι το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού και τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 επηρέασαν σε συνδυασμό αλλά και ανεξάρτητα τη σύνθεση των μικροβιακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, καθώς επίσης και την έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την ενίσχυση της εντερικής υγείας και ακεραιότητας.

Συμπερασματικά, τα φυτοβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν είχαν θετική επίδραση επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, αύξησαν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα αίματος και στο κρέας των ορνιθίων καθώς επίσης μετέβαλαν την έκφραση γονιδίων, με τρόπο που συνάδει με τη βελτίωση της εντερικής υγείας και ακεραιότητας.

Λέξεις κλειδιά: φυτοβιοτικά, ενέργεια, πρωτεΐνη, αραβόσιτος, σιτάρι, πρωτεΐνες στενού συνδέσμου, υποδοχείς Toll-like, εντερική μικροχλωρίδα

NUTRITIONAL EFFECTS FOLLOWING PHYTOGENIC ADDITION ON THE IMPRINT OF GUT ECOLOGY PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF BROILER CHICKENS

*Faculty of Animal Science and Aquaculture, Department of Nutritional Physiology
and Feeding, Iera Odos 75, Athens 11855*

ABSTRACT

The aim of the present thesis was to evaluate the effects of the inclusion of phytobiotics in combination with different types of broiler chicken diets over their productive performances and the parameters of their intestinal health and function. For this purpose two different mixtures of phytobiotics, PFA1 (based on oregano, anise, and citrus essential oils) and PFA2 (a mixture of phytogenic components based on menthol, anethol, and eugenol), have been studied in relation /or not to the energy and protein levels of the respective diet or the type of cereal administrated (corn or wheat). A thorough analysis on important productive, biochemical, and molecular markers was conducted, such as broiler growth performance, feed consumption, feed conversion ratio, mortality rate, nutrient digestibility, total antioxidant capacity (TAC) in plasma and meat, as well as other biomarkers. Furthermore, the intestinal flora composition as well as the expression of genes related to the intestinal health and integrity was also determined. The abovementioned analytics were performed in the framework of five experimental studies, which also constitute separate chapters of this thesis.

To be more specific, the first and forth study examined the effect of reduced dietary energy (ME) and protein (CP) levels along with administration of PFA1 on broiler growth performance, nutrient digestibility, meat and blood biochemical parameters and total antioxidant capacity (TAC), gut microbiota composition and gene expression of toll-like receptor(s) (TLR), tight junction (TJ) proteins and inflammatory cytokines expressed in secondary lymphoid organs. For each growth period three diet types (A, B and C) were formulated. Diet type A served as a positive control and was formulated according to Cobb recommendations for maximizing white meat yield. Diet types B and C were down regulated in terms of ME and CP by

3% and 6%, respectively. The ME:CP ratio was maintained constant. The duration of the experiment was 42d and 450 1-d old, male Cobb broilers were used. The statistical analysis of the results from the two aforementioned studies was prepared with the general linear model, using as factors the diet type, (A, B, and C) and the PFA1 supplementation (0 and 125 mg/kg).

It was found that, while the decrease in energy and protein levels had as a result a significant deterioration of the feed conversion ratio (FCR), during the growth period ($P_D=0.021$) and overall ($P_D=0.010$), the PFA1 supplementation showed a trend to improve FCR during the starter ($P_{Ph1}=0.090$), grower ($P_{h1}=0.057$) period, and overall ($P_{Ph1}=0.089$). Additionally, PFA inclusion reduced cholesterol ($P_{Ph}=0.002$) and increased plasma TAC ($P_{Ph}<0.001$). Moreover, PFA increased breast ($P_{Ph1}=0.001$) and thigh ($P_{Ph1}=0.01$) TAC. Furthermore, PFA1 supplementation resulted in higher levels of cecal mucosa-associated *Bacteroides* ($P_{Ph1}=0.031$), *Clostridium* cluster IV ($P_{Ph1}=0.007$) and *Clostridium* cluster XIVa ($P_{Ph1}=0.039$). Finally, lower TLR2 ($P_{Ph1}=0.021$) and higher zonula occludens 2 (ZO-2) ($P_{Ph1}=0.031$) relative gene expressions in ileal epithelium and lower TLR2 ($P_{Ph1}<0.001$) and higher ZO-2 ($P_{Ph1}=0.009$), claudin 5 (CLDN5) ($P_{Ph1}=0.005$) and occludin (OCLN) ($P_{Ph1}=0.039$) relative gene expressions in cecal epithelium, were resulted following PFA1 supplementation. In conclusion, a reduction in dietary ME and CP levels, adversely affected the FCR, whereas PFA1 supplementation tended to compensate these effects. Moreover, the addition of PFA1 beneficially modulated plasma cholesterol, plasma and meat TAC, elements of gut microbiota, Toll-like signaling molecules and gut tight junction genes.

The supplementation of PFA2 was examined in the second, third and fifth study. More specifically, in the second and third study the effects of inclusion levels OF PFA2, on broiler growth performance, nutrient digestibility, biochemical biomarkers and total antioxidant capacity (TAC) of plasma and meat, as well as on the relative expression of selected cytokines, were studied in a 42-d experiment. A total of 225 one-day-old male Cobb broiler chickens were used in each study and the diets were based on maize-soybean meal (second study) and wheat-soybean meal (third study). The experimental data were analyzed with the ANOVA procedure and linear and quadratic effects of dietary PFA inclusion level were studied using polynomial contrasts. In the second study, FCR during finisher phase was improved quadratically

($P=0.009$) with increasing PFA level. Overall, increasing PFA level increased body weight gain (BWG) in a linear ($P=0.018$) and quadratic ($P=0.016$). Total tract apparent digestibility of dry matter increased linearly ($P=0.001$) and quadratically ($P=0.023$) with increasing PFA level. The apparent metabolizable energy corrected for nitrogen (AMEn) also increased linearly ($P=0.005$). Increasing PFA level resulted in a linear ($P < 0.05$) increase in blood plasma TAC. Overall, this study provided new evidence for the beneficial role of PFA2 as a natural growth and health promoter in broiler chickens when it is supplemented in diets based on maize-soybean meal.

In the third study increasing PFA level increased ($P=0.044$) BWG at finisher period, decreased quadratically ($P=0.035$) overall feed intake, and quadratically improved ($P=0.024$) overall FCR. Moreover, increasing PFA level increased plasma total antioxidant capacity linearly ($P=0.001$) whereas linearly decreased ($P=0.005$) triglyceride concentration. Thigh meat cholesterol decreased linearly ($P=0.016$) with increasing PFA level. In conclusion, PFA inclusion at 100 mg/kg diet affected positively performance whereas a stronger improvement mainly in plasma total antioxidant capacity and triglyceride as well as in meat cholesterol was noted for the 150 mg/kg diet level.

In the fifth study cereal type and the inclusion level of PFA2 were assessed for their effects on broiler gut microbiota composition, and expression of genes relevant for a functional gut barrier at ileal and cecal level.. The statistical analysis of the results from was prepared with the general linear model, using as factors the cereal type, (maize or wheat) and PFA2 inclusion level (i.e. 0, 100 and 150 mg/kg diet). The duration of the experiment was 42d and 450 1-d old, male Cobb broilers (from the second and third study) were used. Wheat fed broilers had increased levels of mucosa-associated *Lactobacillus* ($P_C=0.007$) and digesta *Bifidobacterium* ($P_C<0.001$) as well as lower levels of *Clostridia* subgroups I, IV and XIVa ($P_C\leq 0.05$), compared to maize. Wheat had increased ($P_C\leq 0.05$) ileal ZO-2 and decreased ileal and cecal TLR2 and IgA expression, compared to maize. On the other hand, PFA inclusion at 100 mg/kg increased the ileal mucosa expression of CLDN5 ($P_{Ph2}=0.023$) and MUC2 ($P_{Ph2}=0.001$) genes, while at 150 mg/kg decreased cecal TLR2 ($P_{Ph2}=0.022$) gene expression compared to the un-supplemented controls. In summary, in the fifth study cereal type and PFA affected in combination and independently broiler gut microbiota composition as well as the expression of critical gut barrier genes including TLR2.

In conclusion, this thesis provided new evidence that two different phytogenic feed additives (PFA1 and PFA2) beneficially affected broiler growth performance, antioxidant status and enhanced intestinal integrity and health.

Keywords: phytogenics, broilers, energy and protein levels, maize diets, wheat diets, tight junctions, toll-like receptors, gut microbiota composition

Αφιερωμένο στη Μνήμη του Πατέρα μου,

Παρασκευά Βύρωνα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ πως η βοήθεια και η στήριξη κάποιων ανθρώπων αποτέλεσε κινητήριο δύναμη για εμένα ώστε να καταφέρω να ολοκληρώσω αυτό το ιδιαίτερα όμορφο και παράλληλα πολύ δύσκολο κεφάλαιο της ζωής μου. Για την εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής απαιτείται σωστή καθοδήγηση από τον επιβλέποντα Καθηγητή σου, στήριξη από την οικογένεια και τους ανθρώπους σου και ένα ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που θα εξασφαλίζει την καλή συνεργασία και το θετικό κλίμα. Για αυτό το λόγο κρίνω ως απαραίτητο να ευχαριστήσω ειλικρινά ένα σύνολο ανθρώπων που με τον τρόπο του ο καθένας βοήθησε στην εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής, κ. Μουντζούρη Κωνσταντίνο, για την πολύτιμη και ουσιαστική επίβλεψη, στήριξη, καθοδήγηση αλλά και για την γενικότερη πορεία μου όλα τα χρόνια από την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης μέχρι την ολοκλήρωση της Διδακτορικής μου Διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Φεγγερό Κωνσταντίνο, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης για την άριστη συνεργασία και πολύτιμη στήριξή του. Τον Καθηγητή κ. Πολίτη Ιωάννη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Οικονομόπουλο Ιωάννη για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή και τις πολύτιμες διορθώσεις και συμβουλές τους.

Θα ήθελα εξίσου να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στις υποψήφιες διδάκτορες Γκρίελα Ειρήνη και Παλαμίδη Ίριδα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής και όλους τους συναδέλφους που βοήθησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και των εργαστηριακών αναλύσεων, αλλά και για το άριστο περιβάλλον που δημιουργήσαμε ώστε να μην κάνουμε την διάρκεια των σπουδών μας <αναγκαστική> αλλά ευχάριστη και δημιουργική.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τις Καθηγήτριες κ. Παναγιώτα Φλώρου-Πανέρη, κ. Ευτέρπη Χρηστάκη-Σαδικάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παππά Αθανάσιο για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις τους κατά τη διόρθωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η εκπόνηση της παρούσας Διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση του πατέρα μου Παρασκευά Βύρωνα, της μητέρας

μου Παρασκευά Μαργαρίτας, της γυναίκας μου Εβρενέζογλου Μαρίας και του αδελφού μου Παρασκευά Αλέξανδρου, οι οποίοι παρείχαν το κατάλληλο περιβάλλον εκτός Πανεπιστημίου για την ολοκλήρωση ενός από τα σπουδαιότερα κεφάλαια της ζωής μου και για αυτό το λόγο θέλω να τους ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
Συνοτομογραφίες	19
Πίνακες	21
Σχήματα	23
Εικόνες.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	25
1.1 Γενικά για τα φυτοβιοτικά	25
1.2 Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της προσθήκης των φυτοβιοτικών	30
1.2.1 Σύσταση φυτοβιοτικών	30
1.2.2 Επίπεδα προσθήκης φυτοβιοτικών	37
1.2.3 Σύσταση βασικού σιτηρεσίου	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	44
2.1 Μεταβολισμός βιοενεργών συστατικών φυτοβιοτικών	44
2.2 Επίδραση των φυτοβιοτικών επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των παχυνόμενων ορνιθίων.....	45
2.3 Φυτοβιοτικά και πεπτικότητα	50
2.4 Επίδραση φυτοβιοτικών σε βιοχημικές παραμέτρους στο αίμα.....	53
2.5 Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών	57
2.5.1 Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο πλάσμα αίματος.....	59
2.5.2 Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο κρέας	63
2.6 Αντιμικροβιακή δράση φυτοβιοτικών	66
2.7 Επίδραση φυτοβιοτικών επί της φλεγμονώδους απόκρισης	70
2.8 Επίδραση φυτοβιοτικών επί βιοδεικτών της εντερικής ακεραιότητας	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο ΜΕΛΕΤΗ 1	88
4.1 Σκοπός	88
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	88
4.2.1 Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις.....	88

4.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	92
4.2.3 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών	92
4.2.4 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος.....	93
4.2.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικής πρωτεΐνης στο κρέας	94
4.2.6 Στατιστική ανάλυση	95
4.3 Αποτελέσματα	95
4.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά.....	95
4.3.2 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών	96
4.3.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοχημικές παράμετροι στο πλάσμα του αίματος.....	96
4.3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, χοληστερόλη και ολική πρωτεΐνη στο μηρό και στο στήθος.....	102
4.4 Συζήτηση – σχολιασμός.....	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο ΜΕΛΕΤΗ 2.....	112
5.1 Σκοπός	112
5.2 Υλικά και Μέθοδοι	113
5.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις	113
5.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	115
5.2.3 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών	115
5.2.4 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος.....	116
5.2.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (στήθος και μηρό).....	117
5.2.6 Απομόνωση RNA και PCR αντίστροφης μεταγραφής	117
5.2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real-time PCR).....	118
5.2.8 Στατιστική ανάλυση	123
5.3 Αποτελέσματα	123
5.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά.....	123
5.3.2 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και συντελεστή φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένος για το άζωτο (AME _N)	127
5.3.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοχημικές παράμετροι στο πλάσμα του αίματος.....	129
5.3.4 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (στήθος και μηρός)	131

5.3.5 Κυτταροκίνες	133
5.4 Συζήτηση – σχολιασμός.....	136
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο ΜΕΛΕΤΗ 3	143
6.1 Σκοπός	143
6.2 Υλικά και μέθοδοι.....	143
6.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις	143
Ολική πρωτεΐνη (g/kg).....	145
6.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	147
6.2.3 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών	147
6.2.4 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος.....	147
6.2.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (στήθος και μηρό) και συγκέντρωσης χοληστερόλης στο κρέας (μηρό).	147
6.2.6 Απομόνωση RNA και PCR αντίστροφης μεταγραφής	147
6.2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real-time PCR).....	147
6.2.8 Στατιστική ανάλυση	148
6.3 Αποτελέσματα	148
6.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων 42 ημερών.....	148
6.3.2 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και συντελεστής φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένος για το άζωτο (AME _N) ορνιθίων 42 ημερών.	150
6.3.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοχημικές παράμετροι στο πλάσμα του αίματος ορνιθίων 42 ημερών.....	152
6.3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκέντρωση χοληστερόλης στο κρέας ορνιθίων 42 ημερών.....	154
6.3.5 Σχετική γονιδιακή έκφραση κυτταροκινών στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων.....	156
6.4 Συζήτηση-Σχολιασμός	158
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο ΜΕΛΕΤΗ 4	165
7.1 Σκοπός	165
7.2 Υλικά και μέθοδοι.....	165
7.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις	165
7.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	166
7.2.3 Δειγματοληψία δειγμάτων για μοριακές αναλύσεις.....	166

7.2.4 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων	166
7.2.5 Απομόνωση RNA και προσδιορισμός σχετικής έκφρασης γονιδίων στόχων σε επιθήλιο ειλεού και τυφλών εντέρων, λεμφαδένες τυφλού εντέρου και σπλήνα	170
7.2.6 Στατιστική ανάλυση	172
7.3 Αποτελέσματα	175
7.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	175
7.3.2 Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών στον ειλέο και στα τυφλά έντερα	177
7.3.3 Σχετική γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, των υποδοχέων Toll-like και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στο εντερικό επιθήλιο του ειλεού και τυφλών εντέρων.....	183
7.3.4 Σχετική γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών στο σπλήνα και στα τυφλά έντερα	186
7.4 Συζήτηση-σχολιασμός	189
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ^ο ΜΕΛΕΤΗ 5	201
8. 1. Σκοπός	201
8. 2. Υλικά και Μέθοδοι	202
8.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις	202
8.2.2 Δειγματοληψία δειγμάτων για μοριακές αναλύσεις.....	202
8.2.3 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων	202
8.2.4 Απομόνωση RNA και προσδιορισμός σχετικής έκφρασης γονιδίων στόχων σε επιθήλιο ειλεού και τυφλών εντέρων.....	203
8.2.5 Στατιστική Ανάλυση	203
8.3 Αποτελέσματα	206
8.3.1 Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών στο επιθήλιο και στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων.....	206
8.3.2. Σχετική γονιδιακή έκφραση οι υποδοχείς Toll-like, οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου, μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, η μουκίνη 2 και η ανοσοσφαιρίνη Α στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων.....	210
8.4 Συζήτηση – Σχολιασμός.....	215
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ^ο ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	221
Βιβλιογραφία	239
Διεθνής	239
Ελληνική	262

Παράρτημα. Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά και σε πρακτικά συνεδρίων, συμμετοχές σε ερευνητικά προγράμματα.....	264
Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά στο πλαίσιο της Διδακτορικής Διατριβής.....	264
Λοιπές Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά Περιοδικά.....	264
Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Ελληνικών Συνεδρίων	265
Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Διεθνών Συνεδρίων	266
Συμμετοχή σε ερευνητικά Προγράμματα	268

Συντομογραφίες

ΦΣ1: μίγμα φυτογενών συστατικών 1

ΦΣ2: μίγμα φυτογενών συστατικών 2

Μ.Ε.: μεταβολιστέα ενέργεια

Ο.Π.: ολική πρωτεΐνη

Ρ.Α.Σ.Β.: ρυθμός αύξησης σωματικού Βάρους

Κ.Τ.: κατανάλωση τροφής

Σ.Ε.Τ.: συντελεστής εκμετάλλευσης τροφής

Μ.Α.Ε.: μίγμα αιθέριων ελαίων

Ο.Ο.: οργανική ουσία

Λ.Ο.: λιπαρές ουσίες

Α.Ο.: αζωτούχες ουσίες

Ξ.Ο.: ξηρά ουσία

ΑΜΕ_N: φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια διορθωμένη για το άζωτο

Σ.Ε.: συνολική ενέργεια

Τ.Σ.: τύπος σιτηρεσίου

TLRs: υποδοχείς Toll-like

GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης

iNOS: επαγόμενη συνθετάση του NO

TGF-β4: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β4

IL-1β: ιντερλευκίνη 1β

IL-6: ιντερλευκίνη 6

IL-8: ιντερλευκίνη 8

IL-10: ιντερλευκίνη 10

IL-12: ιντερλευκίνη 12

NF-κB: Μεταγραφικός Παράγοντας

IFN-γ: ιντερφερόνη γ

OCLN: οκλουδίνη

CLDNs: κλαουδίνες

ZO: zonula οκλουδίνες

MUC: βλεννοπρωτεΐνες

JAMs: συνδεσμικά μόρια προσκόλλησης

Πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 1.1	Κατηγορίες μονοτερπενίων	32
Πίνακας 1.2	Κατηγορίες φαινυλοπροπυνοειδών	33
Πίνακας 1.3	Συστατικά των κυριότερων αιθέριων ελαίων	36
Πίνακας 2.1	Επίδραση των φυτοβιοτικών επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των παχυνόμενων ορνιθίων	45
Πίνακας 2.2	Επίδραση φυτοβιοτικών στην ειλεακή πεπτικότητα	51
Πίνακας 2.3	Επίδραση φυτοβιοτικών στην ολική πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και την φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια της τροφής	52
Πίνακας 2.4	Επίδραση φυτοβιοτικών σε βιοχημικές παραμέτρους στο αίμα	55
Πίνακας 2.5	Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο πλάσμα του αίματος	60
Πίνακας 2.6	Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο κρέας	64
Πίνακας 2.7	Αντιμικροβιακή δράση φυτοβιοτικών	69
Πίνακας 2.8	Επίδραση φυτογενών φυτοβιοτικών σε βιοδείκτες που σχετίζονται με την προ- και αντιφλεγμονώδη ανοσοβιολογική απόκριση	74
Πίνακας 2.9	Επίδραση φυτοβιοτικών επί της εντερικής ακεραιότητας	80
Πίνακας 4.1	Συστατικά (g/kg) και υπολογισμένη/προσδιορισμένη χημική σύσταση (g/kg σιτηρεσίου) των πειραματικών σιτηρεσίων	90
Πίνακας 4.2	Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης (1-14 ^η), της φάσης ανάπτυξης (15-28 ^η), της φάσης πάχυνσης (29-42 ^η) και συνολικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (1-42 ^η)	98
Πίνακας 4.3	Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια (AME)	100
Πίνακας 4.4	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	101
Πίνακας 4.5	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκέντρωση χοληστερόλης και πρωτεΐνης στο κρέας ορνιθίων 42 ημερών	103
Πίνακας 5.1	Συστατικά (g/kg) και υπολογισμένη/προσδιορισμένη χημική σύσταση (g/kg σιτηρεσίου) του σιτηρεσίου	114
Πίνακας 5.2	Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR	121
Πίνακας 5.3	Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης (1-14 ^η), της φάσης ανάπτυξης (15-28 ^η), της φάσης πάχυνσης (29-42 ^η) και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (1-42 ^η)	124
Πίνακας 5.4	Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια διορθωμένη για το άζωτο (AME _N)	128
Πίνακας 5.5	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεντρώσεις	130

	πρωτεΐνης, τριγλυκεριδίων, γλυκόζη και χοληστερόλης στο πλάσμα αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	
Πίνακας 5.6	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο κρέας ορνιθίων 42 ημερών	131
Πίνακας 5.7	Σχετική γονιδιακή έκφραση TGF-β4, IL-18, IL-10, iNOS, IL-2 and IFN-γ στο σπλήνα και στους λεμφικούς αδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών	134
Πίνακας 6.1	Συστατικά (g/kg) και υπολογισμένη/προσδιορισμένη χημική σύσταση (g/kg σιτηρεσίου) του σιτηρεσίου	145
Πίνακας 6.2	Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR	148
Πίνακας 6.3	Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης (1-14 ^η), της φάσης ανάπτυξης (15-28 ^η), της φάσης πάχυνσης (29-42 ^η) και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (1-42 ^η)	149
Πίνακας 6.4	Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και συντελεστής φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένης για το άζωτο (AME _N)	150
Πίνακας 6.5	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, τριγλυκεριδίων, γλυκόζη και χοληστερόλης στο πλάσμα αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	153
Πίνακας 6.6	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκέντρωση χοληστερόλης στο κρέας	155
Πίνακας 6.7	Σχετική γονιδιακή έκφραση TGF-β4, IL-18, IL-10, iNOS, IL-2 and IFN-γ στο σπλήνα και στους λεμφικούς αδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών	157
Πίνακας 7.1	Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές με στόχο το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA) που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των μικροβιακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και το εντερικό περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων με χρήση της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου	168
Πίνακας 7.2	Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR.	173
Πίνακας 7.3	Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων συνολικά για όλη (1-42 ^η) τη διάρκεια της πρώτης μελέτης (Κεφάλαιο 4)	176
Πίνακας 7.4	Επίπεδα βακτηριακών πληθυσμών στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια 42 ημερών	178
Πίνακας 7.5	Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών εντερικού περιεχομένου ειλεού και τυφλών εντέρων ορνιθίων 42 ημερών	181
Πίνακας 7.6	Σχετική γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (ZO1, ZO2, CLDN1, CLDN5, OCLN), των υποδοχέων Toll-like (TLR2, TLR4) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια 42 ημερών	184
Πίνακας 7.7	Σχετική γονιδιακή έκφραση TGF-β4, IL-18, IL-10, iNOS, IL-2 and IFN-γ στο σπλήνα και στους λεμφικούς αδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών	187
Πίνακας 8.1	Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers)	204

	που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR	
Πίνακας 8.2	Επίπεδα βακτηριακών πληθυσμών στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια 42 ημερών	207
Πίνακας 8.3	Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών εντερικού περιεχομένου ειλεού και τυφλών εντέρων ορνιθίων 42 ημερών	208
Πίνακας 8.4	Σχετική γονιδιακή έκφραση οι υποδοχείς Toll-like, οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου, μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, η μουκίνη 2 και η ανοσοσφαιρίνη Α στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων	212
Πίνακας 9.1	Συνοπτική παρουσίαση επίδρασης των χρησιμοποιούμενων φυτοβιοτικών, στις κυριότερες εξεταζόμενες παραμέτρους, στην παρούσα διδακτορική διατριβή	237

Σχήματα

ΣΧΗΜΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Σχήμα 1	Ευεργετικές επιδράσεις των φυτοβιοτικών στην παραγωγικότητα και υγεία των ορνιθίων κρεοπαραγωγής	27
Σχήμα 2	Χημική δομή επιλεγμένων κύριων συστατικών αιθέριων ελαίων	34
Σχήμα 3	Απεικόνιση οδού προ-αντιφλεγμονώδους απόκρισης στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου	72
Σχήμα 4	Πιθανή επίδραση φυτοβιοτικών επί της ρύθμισης της έκφρασης βιοδεικτών που εμπλέκονται στην οδό μεταγωγής μηνυμάτων των υποδοχέων toll-like σε ορνίθια κρεοπαραγωγής	76
79Σχήμα 5	Σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (tight junctions) στο εντερικό επιθήλιο	79
Σχήμα 6	Πιθανές επιδράσεις φυτοβιοτικών επί παραγόντων που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα στο εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής	83
Σχήμα 7	Παράγοντες που επηρεάζουν την εύρυθμη λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα	85
Σχήμα 8	Συνοπτική παρουσίαση των κυριότερων αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την πρώτη και τέταρτη μελέτη της πρώτης και τέταρτης μελέτης	224
Σχήμα 9	Συνοπτική απεικόνιση αποτελεσμάτων δεύτερης και τρίτης μελέτης	231
Σχήμα 10	Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων 5ης μελέτης	235

Εικόνες

ΕΙΚΟΝΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Εικόνα 1	RNA μετά από καθαρισμό με DNase	117
Εικόνα 2	Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System	119
Εικόνα 3	Ανάλυση καμπυλών (melting curve analysis)	120

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για τα φυτοβιοτικά

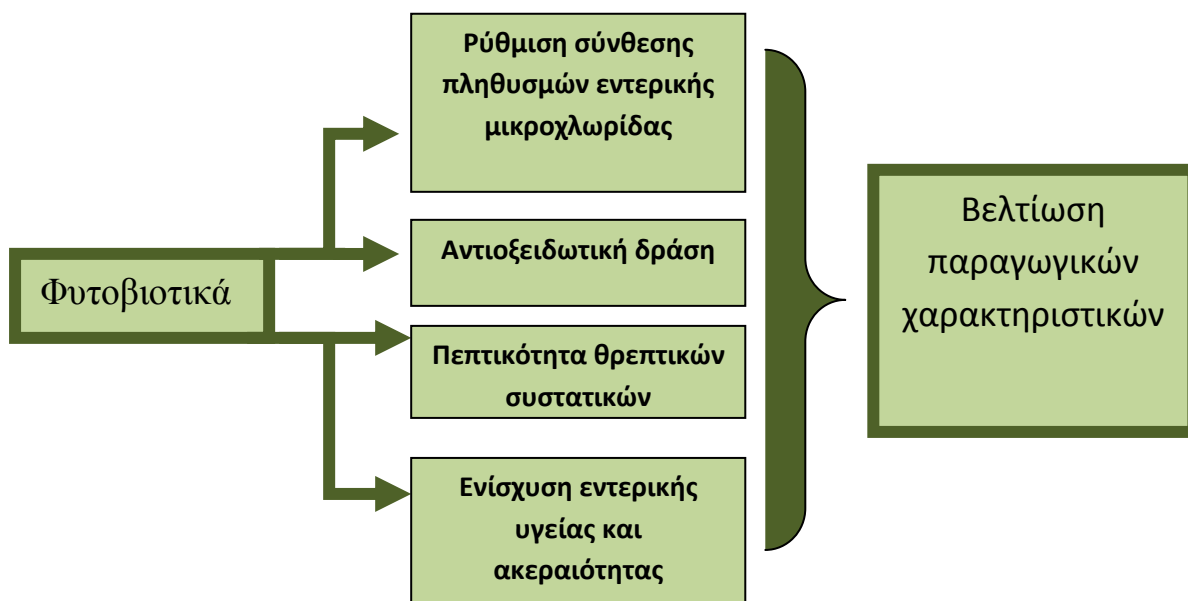
Τα αντιβιοτικά μέχρι και τα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας χρησιμοποιούνταν ευρέως ως αυξητικοί παράγοντες στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με θετική επίδραση επί του ρυθμού ανάπτυξης, της εκμετάλλευσης και της αξιοποίησης της τροφής, καθώς και επί της μείωσης της νοσηρότητας και της θνησιμότητας των πτηνών λόγω κλινικών ασθενειών (Brenes and Roura, 2010; Zeng *et al.*, 2015). Παρόλα αυτά, η αλόγιστη χρήση τους, οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών που μπορούσαν να προσβάλλουν τόσο τα ζώα όσο και τον άνθρωπο ενώ επιπρόσθετα ενοχοποιήθηκαν και για την εμφάνιση καταλοίπων τους στους ιστούς των ζώων (Najafi *et al.*, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011). Έτσι η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων, απαγορεύθηκε σε όλα τα κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης από την 1^η Ιανουαρίου του 2006 (EC Regulation No. 1831/20031) και τείνει να περιοριστεί παγκοσμίως, ενώ είχε ήδη περιοριστεί από το 1999, στην εκτροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Lee *et al.*, 2004; Brenes and Roura, 2010; Huyghebaert *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2015). Πρέπει να σημειωθεί πως και σε άλλες χώρες όπως για παράδειγμα στις Η.Π.Α., το καταναλωτικό κοινό πιέζει προς την κατεύθυνση της μη χρησιμοποίησης των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Gheisar and Kim, 2016).

Η απαγόρευση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων αλλά και ως παραγόντων πρόληψης ασθενειών στα ορνίθια κρεοπαραγωγής είχε ως αποτέλεσμα επιδείνωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής αλλά και την εμφάνιση ορισμένων προβλημάτων στην εντερική υγεία όπως η νεκρωτική εντερίτιδα και η δυσβακτηρίωση του εντέρου (Huyghebaert *et al.*, 2011). Η μη απαγόρευση και χρήση κοκκιδιοστατικών ουσιών στο σιτηρέσιο των πτηνών (Lee *et al.*, 2004), εξομάλυνε ως ένα βαθμό τις αρνητικές συνέπειες της απαγόρευσης των αντιβιοτικών (Huyghebaert *et al.*, 2011). Ως συνέπεια των παραπάνω, δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης νέων επιπρόσθετων εναλλακτικών λύσεων ως πρόσθετες ύλες στην διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, που θα μπορούν να ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις του παραγωγού αλλά και του σύγχρονου καταναλωτή. Έτσι, πρόσθετες ύλες όπως τα φυτοβιοτικά, τα

πρεβιοτικά, τα προβιοτικά, τα οργανικά οξέα, τα ένζυμα κ.ά., εξετάζονται ως εναλλακτικές λύσεις των αντιβιοτικών στην διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής αλλά και γενικότερα στη ζωική παραγωγή (Brenes and Roura, 2010, Zeng *et al.*, 2015) ενώ οι περισσότερες από αυτές έχουν ήδη καθιερωθεί στην διατροφή των παραγωγικών ζώων (Zeng *et al.*, 2015).

Τα φυτοβιοτικά περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος προϊόντων φυτικής προέλευσης όπως ολόκληρα μέρη αποξηραμένων αρωματικών φυτών, αιθέρια έλαια και μίγματα τους, επιμέρους συστατικά αιθέριων ελαίων και ολεορεσίνες (Windisch *et al.* 2008; Gheisar and Kim, 2016) και επιπρόσθετα θεωρούνται γενικά ασφαλείς και κοινά χρησιμοποιούμενες πρόσθετες ύλες στη βιομηχανία τροφίμων (Varel, 2002). Ειδικότερα τα αιθέρια έλαια, είναι πολύπλοκα μίγματα δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και αποτελούνται από φαινυλοπροπενοειδή και τερπένια. Εξάγονται με μεθόδους εκχύλισης και κλασματικής απόσταξης από άνθη, βλαστούς, σπόρους, φύλλα, κλαδιά, βότανα, φρούτα και ρίζες αρωματικών φυτών. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες αναφέρεται πληθώρα θετικών επιδράσεων τους στην ζωική παραγωγή αλλά και στον άνθρωπο με τις πιο σημαντικές από αυτές να είναι η ευεργετική τους επίδραση επί των βιοχημικών παραμέτρων στο πλάσμα του αίματος, η ικανότητα τους να βελτιώνουν την πεπτικότητα, οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές τους ιδιότητες και τέλος η αντιφλεγμονώδης δράση τους (Brenes and Roura, 2010). Ειδικότερα, η χρήση των φυτοβιοτικών ως πρόσθετων υλών στη διατροφή των ορνιθίων παραγωγής έχει παρουσιάσει μεγάλη αύξηση τις τελευταίες δύο δεκαετίες καθώς αυτά προτείνονται ως εναλλακτική έναντι των αντιβιοτικών πρόσθετη ύλη από μεγάλο αριθμό ερευνητών (Gheisar and Kim, 2016). Η κύρια χρήση τους στη διατροφή των παραγωγικών ζώων όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1**, έχει ως κύριο σκοπό την βελτίωση των παραγωγικών τους χαρακτηριστικών. Ειδικότερα στην διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων όπως θα αναλυθεί περισσότερο στο Κεφάλαιο 2, έχει παρατηρηθεί ότι τα φυτοβιοτικά είτε ως αιθέρια έλαια είτε ως μίγματα αιθέριων ελαίων, είτε τα επιμέρους συστατικά τους, ασκούν θετική επίδραση επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών (Tihonen *et al.*, 2010; Amad *et al.*, 2011; Cross *et al.*, 2011; Mountzouris *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a; Paraskeuas *et al.*, 2017b), επί της πεπτικότητας (Amad *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 2011; Mountzouris *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2014), επί των βιοχημικών παραμέτρων (Hong *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014;

Hashemipour *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a; Paraskeuas *et al.*, 2017b), της εντερικής μικροχλωρίδας (Cao *et al.*, 2010; Tihonen *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014; Hashemipour *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2019a), της εντερικής υγείας (Lillehoj and Lee., 2012; Du *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2019b) και ακεραιότητας (Kim *et al.*, 2013; Placha *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2019b). Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι, η διατήρηση της υγείας του εντερικού συστήματος επηρεάζει το σύνολο της φυσιολογικής κατάστασης των ζώων και έχει άμεση σύνδεση με την ικανότητα αξιοποίησης των θρεπτικών συστατικών της τροφής, αλλά και της εμφάνισης ασθενειών στα ζώα. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητή η σημασία της μελέτης της δράσης των αιθέριων ελαίων επί παραγόντων, όπως η πεπτικότητα, οι βιοχημικές παράμετροι αλλά και η σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντερικού συστήματος (Platcha *et al.*, 2014; Celi *et al.*, 2017).



Σχήμα 1. Ενεργητικές επιδράσεις των φυτοβιοτικών στην παραγωγικότητα και υγεία των ορνιθίων κρεοπαραγωγής

Η χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών μπορεί να έχει επιτραπεί για τον έλεγχο της οξείδωσης του λίπους στα τρόφιμα, παρόλα αυτά το καταναλωτικό κοινό αντιμετωπίζει με ανησυχία τη χρησιμοποίησή τους, με άμεση συνέπεια να ανοίγει ο δρόμος για φυσικά αντιοξειδωτικά όπως τα φυτοβιοτικά (Platcha *et al.*, 2014). Τα φυτοβιοτικά αναφορικά με την εφαρμογή τους στην εκτροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες είτε ύστερα από εφαρμογή τους *in vitro* στο κρέας (Chouliara *et al.*, 2007; Fasseas *et al.*, 2008) είτε *in vivo* ύστερα από εφαρμογή τους στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Botsoglou *et al.*, 2002; Placha *et al.*, 2014; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a; Paraskeuas *et al.*, 2017b). Επίσης επιδρούν θετικά επί του ανοσοποιητικού συστήματος (Placha *et al.*, 2014; Popovic *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a). Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί πως τα φυτοβιοτικά παρουσιάζουν έντονη αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα η οποία μπορεί να αποδοθεί όχι μόνο στην αντιοξειδωτική τους δράση αλλά και στην επίδραση τους επί της παραγωγής κυτταροκινών από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα (Frankic *et al.*, 2009; Miguel *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017b).

Παρόλα αυτά, τα φυτοβιοτικά εξακολουθούν να αποτελούν μια σχετικά νέα κατηγορία πρόσθετων υλών στην οποία η γνώση αναφορικά με τον τρόπο δράσης τους αλλά και την μέθοδο εφαρμογής τους στα σιτηρέσια των ζώων είναι περιορισμένη, με άμεση συνέπεια να προσελκύουν διαρκώς το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αλλά και του ευρύτερου τομέα της βιομηχανίας τροφίμων (Zeng *et al.*, 2015). Τα φυτοβιοτικά, είτε ως αιθέρια έλαια είτε ως μίγματα επιμέρους συστατικών εμφανίζουν μεγάλη πολυπλοκότητα και ποικιλία επιδράσεων. Η μεταβλητότητα αυτή στη σύστασή τους καθώς και η ποικιλία των επιδράσεων που προκαλούν σε συνδυασμό με τις περιορισμένες γνώσεις αναφορικά με τον τρόπο δράσης τους που προαναφέρθηκε, περιπλέκει την αξιολόγηση και τον καθορισμό της μεθόδου εφαρμογής τους στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών νεοσσών (Windisch *et al.*, 2008). Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, τα φυτοβιοτικά δεν είναι απλές χημικές ενώσεις αλλά αποτελούν μείγματα διαφόρων συστατικών τα οποία περιέχουν πτητικές αρωματικές ενώσεις οι οποίες εξάγονται από τα αρωματικά φυτά (Zeng *et al.*, 2015). Συνέπεια αυτού του χαρακτηριστικού τους, αποτελεί ότι η βιολογική τους δραστηριότητα αλλά και οι διάφορες επιδράσεις τους επί της παραγωγής και του οργανισμού των ζώων εξαρτώνται από τις επιμέρους συγκεντρώσεις των επιμέρους

συστατικών τους, τα οποία με την σειρά τους έχουν τις δικές τους χαρακτηριστικές ιδιότητες (Zeng *et al.*, 2015). Για παράδειγμα όπως αναφέρεται και παρακάτω στον Πίνακα 3., τα αιθέρια έλαια της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) αποτελούνται από καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο (Burt *et al.*, 2004) σε αναλογίες οι οποίες εξαρτώνται από τον αρχικό σχηματισμό τους στα αντίστοιχα φυτά, την εποχή συγκομιδής του φυτού, την τρόπο καλλιέργειας τους έως και τη διαδικασία της απομόνωσης τους στο εργαστήριο (Figueiredo *et al.*, 2008; Puvaca *et al.*, 2013).

Τα τελευταία χρόνια, το κύριο ερώτημα, σχετικά με τα φυτοβιοτικά, που απασχολεί τους ερευνητές, αναφέρεται στις βιολογικές επιδράσεις τους και αν αυτές είναι αποτέλεσμα των κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων που απαντώνται σε αυτά σε μεγάλες συγκεντρώσεις ή προκύπτουν ως συνέργεια όλων των συστατικών τους ακόμα και αυτών που βρίσκονται σε χαμηλότερες έτσι όπως προκύπτουν αυτές ύστερα από ανάλυση χρωματογραφίας (Bakkali *et al.*, 2008). Στη βιβλιογραφία, στις περισσότερες περιπτώσεις μελετώνται σε πειράματα προσθήκης στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγών ορνιθίων, οι επιδράσεις των κύριων φυτογενών συστατικών των αιθέριων ελαίων όπως η ανηθόλη (Simsek *et al.*, 2007), θυμόλη (Luna *et al.*, 2010), η καρβακρόλη (Lee *et al.*, 2003), η ευγενόλη (Hernandez *et al.*, 2009), η κινναμαλδεύδη (Lee *et al.*, 2004), λεμονένιο (Ebrahimi *et al.*, 2013), η μενθόλη (Ocak *et al.*, 2008; Kamkar *et al.*, 2010; Erhan *et al.*, 2012; Fallah *et al.*, 2013) κ.ά., αλλά και μιγμάτων και εμπορικών σκευασμάτων αυτών (Mitsch *et al.*, 2004; Ertas *et al.*, 2005; Mountzouris *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017b), με σκοπό τη συλλογή νέων δεδομένων αναφορικά με τις επιδράσεις τους και την κατανόηση των τρόπων δράσης των επιμέρους συστατικών τους ή και της συνεργιστικής δράσης αυτών.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, ανάμεσα στους πιο πιθανούς τρόπους δράσης των φυτοβιοτικών είναι η ρύθμιση της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας, της μορφολογίας του εντερικού συστήματος και της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων (Li *et al.* 2012; Gheisar and Kim, 2016). Επιπρόσθετα, η ευεργετική επίδραση των φυτοβιοτικών επί της αντιοξειδωτικής ικανότητας έχει ως πιθανό αποτέλεσμα την αύξηση της ποιότητας του κρέατος αλλά και του χρόνου αποθήκευσής του (Botsoglou *et al.*, 2002; Brenes and Roura, 2010; Gheisar and Kim, 2016). Παρόλα αυτά η βιβλιογραφική ανασκόπηση όπως φαίνεται στο δεύτερο κεφάλαιο έδειξε πως πολλά αποτελέσματα της επίδρασης συγκεκριμένων φυτοβιοτικών σε συνδυασμό ή

μη με παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα χορήγησής τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων επί των εξεταζόμενων παραγόντων είναι αμφιλεγόμενα και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Άμεση συνέπεια αυτού είναι να κρίνεται ως αναγκαία η ολοκληρωμένη και σε βάθος μελέτη των επιδράσεων τους επί παραγόντων που σχετίζονται από τις παραγωγικές αποδόσεις, την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και την αντιοξειδωτική δράση μέχρι την μελέτη παραγόντων και μοριακών βιοδεικτών σχετιζόμενων με την εντερική μικροχλωρίδα, υγεία και ακεραιότητα. Το παραπάνω κενό στη βιβλιογραφία αναφορικά με την επίδραση των φυτοβιοτικών στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής αποτέλεσε και το κίνητρο υλοποίησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

1.2 Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της προσθήκης των φυτοβιοτικών

Η αποτελεσματικότητα της προσθήκης φυτοβιοτικών και κυρίως των αιθέριων ελαίων και των μιγμάτων τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, δύναται να εξαρτάται μεταξύ άλλων, από παράγοντες, όπως το είδος των κύριων αλλά και δευτερευόντων συστατικών τους και η συνεργιστική τους δράση, τα επίπεδα συγκέντρωσης των αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο, η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου, το γονότυπο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, οι περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και οι συνθήκες υγιεινής (Lee *et al.*, 2004; Brenes and Roura 2010; Puvaca *et al.*, 2013; Khattak *et al.*, 2014).

1.2.1 Σύσταση φυτοβιοτικών

Τα φυτοβιοτικά όπως προαναφέρθηκε μεταξύ άλλων είναι ολόκληρα μέρη αρωματικών φυτών αποξηραμένων, αιθέρια έλαια, επιμέρους συστατικά αιθέριων ελαίων και μίγματα τους. Τα αιθέρια έλαια είναι φυσικά μείγματα που παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη πολυπλοκότητα στη σύνθεση τους, η οποία καθιστά δυνατό να αποτελούνται από 20 έως 60 επιμέρους συστατικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η πολυπλοκότητα αυτή, πολλές φορές έχει ως συνέπεια, η εξήγηση των ιδιοτήτων τους

να αποτελεί μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία (Bakkali *et al.*, 2008). Η σύσταση και η δομή των αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών εξαρτάται από πολλούς και ποικίλους παράγοντες. Έτσι παράγοντες όπως, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η εποχή συγκομιδής των αρωματικών φυτών, η γεωγραφική τους θέση, η σύσταση του εδάφους, οι χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι καλλιέργειας, διαδικασία διύγρανσης, οι συνθήκες αποθήκευσης έως την παραλαβή του ελαίου και οι μέθοδοι παραλαβής και ανάλυσης των επιμέρους συστατικών του αποτελούν παράγοντες κριτικής σημασίας αναφορικά με τον καθορισμό της σύστασης και δομής των αιθέριων ελαίων από τα φυτά προέλευσης τους από τα οποία παραλαμβάνονται μέσω εκχύλισης (Burt *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2005).

Μεγάλη διαφορά δύναται να υφίσταται στη σύσταση των αιθέριων ελαίων, στην περίπτωση που η παραλαβή τους πραγματοποιείται από διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού. Για παράδειγμα, το αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από τους σπόρους του κορίανδρου (*Coriandrum sativum*) παρουσιάζει εντελώς διαφορετική σύσταση από αυτό που λαμβάνεται από τα ανώριμα φύλλα του ίδιου φυτού (Delaquis *et al.*, 2002). Επιπρόσθετα, οι Radudienne *et al.* (2005), αναφέρουν μονοτερπένια και σεσκιτερπένια ως τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων του φυτού *Origanum vulgare*, σε ποσοστό 49,8-76,8% των συνολικών αιθερίων ελαίων στα άνθη, και σε ποσοστό 41,9-71,4% στα φύλλα. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η χημική ανάλυση της σύστασης των αιθέριων ελαίων πραγματοποιείται με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας ώστε να εξασφαλίζεται μια απόλυτη και λεπτομερής εικόνα αναφορικά με τη δομή και την περιεκτικότητά τους στα διάφορα επιμέρους συστατικά που τα αποτελούν (Brenes and Roura, 2010).

Τα συστατικά τους, από χημική άποψη διαχωρίζονται σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες βιοσυνθετικής προέλευσης οι οποίες και καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τα βιολογικά χαρακτηριστικά και τις ιδιότητές τους (Bakkali *et al.*, 2008). Η πρώτη και κύρια είναι αυτή των τερπενίων και των τερπενοειδών. Τα τερπένια προέρχονται από τη βασική μονάδα του ισοπρενίου - ισοπεντανίου (C₅). Η ομάδα αυτή αποτελείται από πάρα πολλά μέλη, με εξαιρετική ποικιλότητα δομής. Οι κύριες κατηγορίες τερπενίων είναι τα μονοτερπένια (C₁₀) και τα σεσκιτερπένια (C₁₅). Δευτερεύουσες κατηγορίες, είναι τα ημιτερπένια (C₅), τα διτερπένια (C₂₀), τα τριτερπένια (C₃₀) και τα τετρατερπένια (C₄₀).

Τα περαιτέρω παράγωγα των τερπενίων, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ή την απουσία δακτυλίου, από διπλούς δεσμούς, προσθήκη οξυγόνου ή την στερεοχημεία τους. Όσα τερπένια περιέχουν οξυγόνο, ονομάζονται τερπενοειδή (Bakkali *et al.*, 2008). Τα μονοτερπένια, αποτελούν το 90% των συστατικών των αιθέριων ελαίων και ταξινομούνται ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης τους σε υδατάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, αιθέρες, φαινόλες και υπεροξειδία όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες μονοτερπενίων (Bakkali *et al.*, 2008).

Κατηγορία	Παραδείγματα
χημικών ενώσεων	
Υδατάνθρακες	γ-τερπινένιο, π-κυμένιο, α-πινένιο, καμφένιο
Αλκοόλες	γερανιόλη, λιναλοόλη, καρβεόλη, βορνεόλη, χρυσανθενόλη
Αλδεΐδες	κιτρονελλάλη
Κετόνες	μενθόνη, καρβόνη
Εστέρες	προπιονικός εστέρας
Αιθέρες	1,8 κινεόλη
Φαινόλες	Θυμόλη, καρβακρόλη
Υπεροξειδία	ασκαριδόλη

Έχει εκτιμηθεί ότι, υπάρχουν πάνω από 1000 μονοτερπένια και 3000 σεσκιτερπένια. Τα σεσκιτερπένια, σχηματίζονται από το συνδυασμό τριών μονάδων ισοπρενίου (C15), έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία με τα μονοτερπένια και δύναται να είναι υδατάνθρακες (κουρκουμένιο), αλκοόλες (φαρνεσόλη), κετόνες (αρωματική τουρμερόνη) και υπεροξειδία (οξειδίο καρνοφυλλένιο). Παραδείγματα φυτών στα οποία απαντώνται τα σεσκιτερπένια είναι η σιτρονέλα, η μέντα, ο δυόσμος, το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο, το θυμάρι, το γεράνι, ο ευκάλυπτος, ο κόλιανδρος κ.ά (Bakkali *et al.*, 2008).

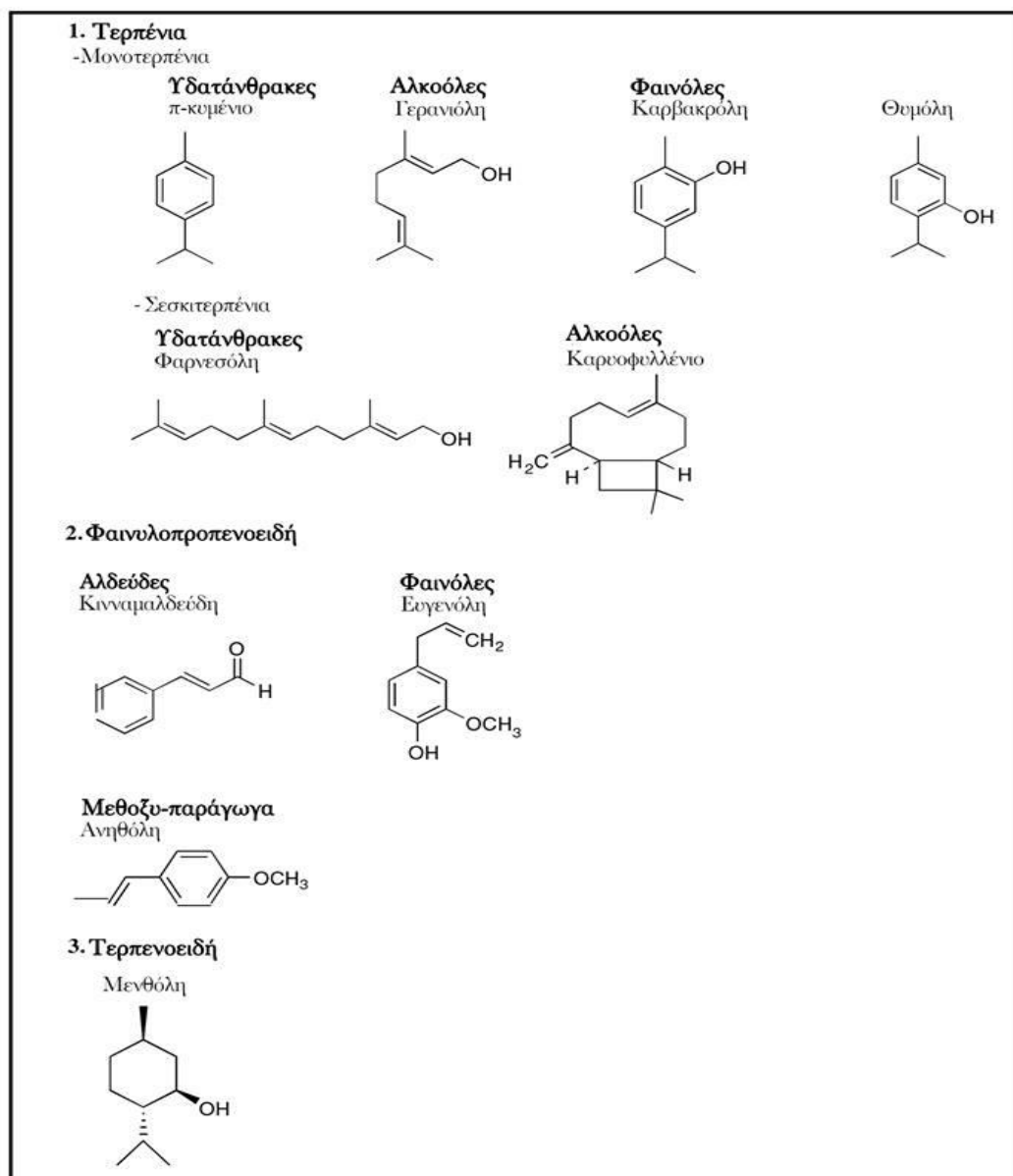
Η δεύτερη κατηγορία συστατικών των αιθέριων ελαίων, αποτελείται από μια μεγάλη ποικιλία χαμηλού μοριακού βάρους αρωματικών και αλειφατικών υδρογονανθράκων. Τα φαινυλοπροπενοειδή όπως ονομάζονται, αποτελούνται από ένα αρωματικό δακτύλιο 6 ατόμων άνθρακα με πλευρική αλυσίδα 3 ανθράκων (συστατικά C6-C3).

Έχουν περιγραφεί μόνο περίπου 50 φαινυλοπροπενοειδή (Lee *et al.*, 2004). Τα φαινυλοπροπενοειδή είναι σχεδόν αποκλειστικά υπεύθυνα για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων (Burt *et al.*, 2004). Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η ανηθόλη, η ευγενόλη, η κινναμωνική αλδεύδη και η βανιλίνη.(Baser and Demirci, 2007; Bakkali *et al.*, 2008,). Αντίστοιχα με τα τερπένια, τα φαινυλοπροπενοειδή κατατάσσονται σε επιμέρους κατηγορίες χημικών ενώσεων όπως αλδεΐδες, αλκοόλες, φαινόλες, μεθοξυ-παράγωγα και μεθυλενοδιόξυ ενώσεις, παραδείγματα των οποίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.2**.

Πίνακας 1.2 Κατηγορίες φαινυλοπροπενοειδών (Bakkali *et al.*, 2008).

Κατηγορία	Παραδείγματα Φαινυλοπροπενοειδών χημικών ενώσεων
Αλδεΐδες	Κινναμαλδεύδη
Αλκοόλες	Κινναμική αλκοόλη
Φαινόλες	Ευγενόλη, χαβικόλη
Μεθοξυ-παράγωγα	Ανηθόλη, εστραγκόλη
Μεθυλενοδιόξυ ενώσεις	Σαφρόλη, απιόλη

Η χημική δομή μερικών επιλεγμένων παραδειγμάτων, κυρίων συστατικών αιθέριων ελαίων από όλες τις κατηγορίες παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2**.



Σχήμα 2. Χημική δομή επιλεγμένων κύριων συστατικών αιθέριων ελαίων (Bakkali et al., 2008).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, παρόλη την πολυπλοκότητα στη σύνθεσή τους, τα μίγματα αιθέριων ελαίων χαρακτηρίζονται κυρίως από δύο με τρία κύρια επιμέρους ενεργά συστατικά τα οποία περιέχονται σε υψηλότερα ποσοστά συγκέντρωσης της τάξης του 20 έως 85 % (Brenes and Roura, 2010) συγκριτικά με τα υπόλοιπα που ανιχνεύονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες κατά τη χημική τους ανάλυση (Senatore, 1996; Bauer et al., 2001). Παραδείγματα τέτοιων κύριων ενεργών συστατικών των αιθέριων

ελαίων αποτελούν, η καρβακρόλη (30%) και η θυμόλη (27%) για τα αιθέρια έλαια της ρίγανης (*Origanum compactum*), το λιμονένιο (91%) για τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από το φλοιό εσπεριδοειδών και πιο συγκεκριμένα του πορτοκαλιού (*Citrus sinensis*), η ανηθόλη (78-95%) για τα αιθέρια έλαια του γλυκάνισου (*Pimpinella anisum*) και η μενθόλη (59%) με την μενθόνη (19%) αναφορικά με τα αιθέρια έλαια της μέντας (*Mentha piperita*) (Bakkali *et al.*, 2008; Brenes and Roura 2010). Οι Ruberto *et al.* (2002), μελέτησαν τη σύσταση των αιθέριων ελαίων του φυτού *Origanum glandulosum*, το οποίο αναφέρεται ότι αποτελείται σε ποσοστό 94% από δύο διαφορετικά είδη μονοτερπένιων, σε ποσοστό 3% από σέσκιτερπενια και το υπόλοιπο από αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες. Στον **Πίνακα 1.3** παρουσιάζονται μερικά αιθέρια έλαια και τα κύρια συστατικά τους σε εκατοστιαία αναλογία.

Οι ιδιότητες των αιθέριων ελαίων, καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τις συγκεντρώσεις και την παρουσία των επιμέρους συστατικών τους (Bakkali *et al.*, 2008). Παραδείγματος χάριν, στην μελέτη των Burt *et al.* (2004), αναφέρεται ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη αποτελούν το 78-82% του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και δρουν με αντιοξειδωτικό τρόπο επί των κυττάρων. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται από δύο μονοτερπένια, το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο που συνιστούν το 5-7% του αναφερόμενου αιθέριου ελαίου. Στην μελέτη των Brenes και Roura (2010), αναφέρεται ότι η δραστηριότητα των κυρίων συστατικών των αιθέριων ελαίων πιθανόν να διαμορφώνεται και από άλλα συστατικά τους που εντοπίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Η υπόθεση αυτή, ενισχύεται από την μελέτη των Mourey και Canillac (2002) στις οποίες συμπεραίνεται πως αιθέρια έλαια τα οποία προέρχονται από φυτά όπως η ρίγανη, ο κολιάνδρος, η κανέλα, το κύμινο και το γλυκοπίπερο και των οποίων τα κύρια συστατικά είναι τερπένια εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση όταν χορηγούνται συνολικά (π.χ. ως αιθέρια έλαια ρίγανης στο σύνολο τους) από όταν χορηγούνται μόνο μείγματα των κύριων συστατικών τους. Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα πως πέραν των κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων των διαφόρων φυτών και τα υπόλοιπα επιμέρους συστατικά τους που απαντώνται σε μικρότερες συγκεντρώσεις -όπως το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο για τα αιθέρια έλαια της ρίγανης- μπορεί να διαδραματίζουν κριτικής σημασίας ρόλο αναφορικά με τις ιδιότητες του εκάστοτε φυτού από το οποίο προέρχονται, όπως στην περίπτωση των αντιοξειδωτικών και αντιβακτηριακών ιδιοτήτων που προαναφέρθηκαν.

Πίνακας 1.3 Συστατικά των κυριότερων αιθέριων ελαίων

Ονομασία Φυτού	Κύρια Συστατικά Αιθέριου Ελαίου	Συγκέντρωση (%)	Βιβλιογραφική αναφορά
Γαρίφαλλο (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ευγενόλη Οξικός ευγενυλεστέρας	75-85% 8-15%	Burt <i>et al</i> 2004
Δενδρολίβανο (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	α-πινένιο οξικό βορνύλιο κάμφορα 1,8-κινεόλη	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%	Burt <i>et al</i> 2004
Ρίγανη (<i>Origanum vulgare</i>)	καρβακρόλη θυμόλη γ-τερπινένιο π-κυμένιο	5-80% 5-65% 3-52% 2-52%	Burt <i>et al</i> 2004
Μέντα (<i>Mentha sp</i>)	μενθόλη	22-42%	Verma <i>et al</i> 2010
Πορτοκάλι (<i>Citrus sinensis</i>)	λιμονένιο	91,5%	Brenes and Roura 2010
Γλυκάνισος (<i>Pimpinella anisum</i>)	ανηθόλη	78-95%	Brenes and Roura 2010
Κανέλλα (<i>Cinnamomum sp</i>)	Trans-κινμαλδεύδη	65%	Burt <i>et al</i> 2004
Θυμάρι (<i>Thymus vulgaris</i>)	θυμόλη καρβακρόλη γ-τερπινένιο π-κυμένιο	10-64% 2-11% 2-31% 10-56%	Burt <i>et al</i> 2004

Συμπερασματικά, πρέπει να θεωρείται ως δεδομένο πως η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων είναι κριτικής σημασίας αναφορικά με τις ιδιότητες τους. Αυτό συμβαίνει διότι ακόμα και τα συστατικά που βρίσκονται σε αυτά σε μικρότερες συγκεντρώσεις επηρεάζουν είτε αυτούσια είτε με συνεργιστικό τρόπο με τα κύρια συστατικά την έκπτυξη των διαφόρων ιδιοτήτων τους οι οποίες θα αναφερθούν αναλυτικότερα σε επόμενες παραγράφους. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν μίγματα αιθέριων ελαίων τα οποία περιείχαν μονοτερπένια όπως η καρβακρόλη και το λεμονένιο προερχόμενα από τα φυτά της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και από φλοιό εσπεριδοειδών (*Citrus sp*) αντίστοιχα, τερπενοειδή όπως η μενθόλη προερχόμενη από το φυτό της μέντας (*Mentha piperita*) και τέλος φαινυλοπροπενοειδή όπως η ανηθόλη και η ευγενόλη προερχόμενα και αυτά με τη σειρά τους από τα φυτά του γλυκάνισου (*Pimpinella anisum*) και γαρύφαλλου (*Syzygium aromaticum*) αντίστοιχα.

1.2.2 Επίπεδα προσθήκης φυτοβιοτικών

Σημαντικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των φυτοβιοτικών, στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής όπως προαναφέρθηκε αποτελούν και τα επίπεδα προσθήκης τους στα σιτηρέσια των πτηνών. Υπάρχουν αναφορές στις οποίες το εύρος των επιπέδων χορήγησης τους, παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με το αν πραγματοποιείται προσθήκη ολόκληρου του φυτού, των αιθέριων ελαίων ή των κυρίων συστατικών τους ή και μιγμάτων αυτών. Σε περιπτώσεις προσθήκης ολόκληρου του αρωματικού φυτού ή σπόρων αυτού, τα επίπεδα προσθήκης κυμάνθηκαν από 0.07 έως 30 g / kg του σιτηρεσίου. Παραδείγματα αποτελούν η προσθήκη ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε συγκέντρωση 10 g / kg (Cross *et al.*, 2007) και σε 30 g / kg σιτηρεσίου (Young *et al.*, 2003), σπόρων γλυκάνισου (*Pimpinella anisum*) σε 0,1,2 και 3 g / kg (Mohammed *et al.*, 2009) και σε 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 και 1.5 g / kg σιτηρεσίου (Soltan *et al.*, 2008), φλοιού εσπεριδοειδών (*Citrus Sinensis*) σε 0, 15 και 30 g/kg σιτηρεσίου (Ebrahimi *et al.*, 2013), άνθη γαρύφαλλου σε σκόνη (*Syzygium aromaticum*) σε 10 g / kg σιτηρεσίου και αποξηραμένη μέντα (*Mentha piperita L.*) σε συγκέντρωση 0.07 g / kg σιτηρεσίου (Ocak *et al.*, 2008). Όταν η χορήγηση στο σιτηρέσιο των ορνιθίων

κρεοπαραγωγής πραγματοποιείται με τη μορφή αιθέριων ελαίων ή των κύριων συστατικών τους τα επίπεδα προσθήκης στη βιβλιογραφία κυμαίνονται από 50 έως 1200 mg / kg σιτηρεσίου. Ενδεικτικά παραδείγματα αυτών αποτελούν η χορήγηση αιθέριων ελαίων γλυκάνισου (*Pimpinella anisum*), σε συγκεντρώσεις 100, 200 και 400 mg / kg (Ciftci *et al.*, 2005; Simsek *et al.*, 2007), αιθέριων ελαίων ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε συγκεντρώσεις 300 mg / kg (Giannenas *et al.*, 2003), 50 και 100 mg / kg (Govaris *et al.*, 2005), 300, 600 και 1200 mg / kg σιτηρεσίου (Roofchae *et al.*, 2011), καρβακρόλης εξαγόμενης από ρίγανη σε συγκέντρωση 100 mg / kg (Mitsch *et al.*, 2004) και 150 mg / kg σιτηρεσίου (Luna *et al.*, 2010), αιθέριων ελαίων εξαγόμενων από μέντα (*Mentha piperita* L.) σε συγκέντρωση 200 mg / kg σιτηρεσίου (Fallah *et al.*, 2013) και αιθέριων ελαίων εξαγόμενων από γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) σε συγκέντρωση 100 mg / kg σιτηρεσίου (Hernandez *et al.*, 2009).

Επιπρόσθετα, σε περίπτωση εφαρμογής στο σιτηρέσιο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων μιγμάτων αιθέριων ελαίων έχει παρατηρηθεί εύρος επιπέδων προσθήκης από 60 έως 1500 mg / kg σιτηρεσίου. Ορισμένες από τις περιπτώσεις αυτές είναι η χορήγηση μίγματος αιθέριων ελαίων προερχόμενων από ρίγανη (*Origanum vulgare*), γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) και φλοιό εσπεριδοειδών (*Citrus sp*) σε συγκέντρωση 125 mg / kg (Hong *et al.*, 2012), σε συγκεντρώσεις 80, 125 και 250 mg / kg (Mountzouris *et al.*, 2011) και 125 mg / kg σιτηρεσίου (Paraskeuas *et al.*, 2016b), μίγματος θυμόλης και καρβακρόλης σε συγκεντρώσεις 60, 100 και 200 mg / kg σιτηρεσίου (Hashemipour *et al.*, 2013), μίγματος αιθέριων ελαίων προερχόμενων από θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και γλυκάνισο (*Pimpinella anisum*) σε συγκέντρωση 150, 750 και 1500 mg / kg σιτηρεσίου (Amad *et al.*, 2011), μίγματος αιθέριων ελαίων εξαγόμενων από ρίγανη (*Origanum vulgare*), γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) και γλυκάνισο (*Pimpinella anisum*) σε συγκεντρώσεις 100, 200 και 400 mg / kg σιτηρεσίου (Ertas *et al.*, 2005) και τέλος μίγματος αιθέριων ελαίων ανηθόλης από γλυκάνισο (*Pimpinella anisum*) και μενθόλης από μέντα (*Mentha piperita*) και ευγενόλης από γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) σε συγκεντρώσεις 100 και 150 mg / kg σιτηρεσίου (Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017b).

Από τα παραπάνω, προκύπτει πως είναι απαραίτητη η μελέτη σε βάθος της απόκρισης των πτηνών σε αυξανόμενα επίπεδα προσθήκης του εκαστοτε υπό εξέταση φυτοβιοτικού έτσι ώστε να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα για το βέλτιστο επίπεδο προσθήκης του που θα παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών επιδράσεων επί των παραγωγικών αποδόσεων και της ποιότητας των εξαγόμενων

προϊόντων από τα ορνίθια. Από τις παραπάνω διακυμάνσεις των επιπέδων προσθήκης των αιθέριων ελαίων ανάμεσα σε τόσες διαφορετικές μελέτες πρέπει να σημειωθεί ότι, οι τιμές των συγκεντρώσεων πρέπει να θεωρηθούν ενδεικτικές. Επίσης, παρόλο που γνωρίζουμε πως τα επίπεδα προσθήκης των αιθέριων ελαίων σε κάθε περίπτωση παίζουν εξαιρετικά κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση των θετικών επιδράσεων τους στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Lee *et al.*, 2004; Puvaca *et al.*, 2013), η γνώση που έχουμε για τη βέλτιστη συγκέντρωση τους σε κάθε περίπτωση που προαναφέρθηκε είναι περιορισμένη και περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την εξαγωγή συμπερασμάτων με εξειδίκευση πάντα για το κάθε χρησιμοποιούμενο μείγμα και σκεύασμα ξεχωριστά. Με βάση τα παραπάνω, καταλήγουμε στο γεγονός πως κάθε μελέτη η οποία εξετάζει τις επιδράσεις της προσθήκης ενός σκευάσματος αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων προσφέρει νέα και χρήσιμα δεδομένα αναφορικά με το βέλτιστο επίπεδο χορήγησης τους και τη συνεργιστική δράση των συστατικών τους σε κάθε μια εξεταζόμενη περίπτωση.

1.2.3 Σύσταση βασικού σιτηρεσίου

Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου, αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα χορήγησης των φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Αναφορικά με το βασικό τύπο σιτηρεσίου στην συντριπτική πλειοψηφία των μελετών αλλά και στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται κυρίως δημητριακοί καρποί όπως, ο αραβόσιτος, το σιτάρι ή και συνδυασμός αυτών. Η καλλιέργεια σιταριού ανερχόταν για το 2011 στους 630 εκατομμύρια τόνους παγκοσμίως (Singh *et al.*, 2011), με την αντίστοιχη του 2003 να ανέρχεται στους 550 (Cowieson *et al.*, 2005). Το σιτάρι είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά των σιτηρεσίων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής προσφέροντας πάνω από το 70 % της μεταβολιστέας ενέργειας και καλύπτοντας περίπου 40 % των αναγκών σε πρωτεΐνη των πτηνών (Hew *et al.*, 1998). Συγκριτικά με άλλους δημητριακούς καρπούς όμως η ποιότητα και η σύσταση του σε θρεπτικά συστατικά μπορεί να ποικίλει σε πολύ μεγάλο βαθμό (Hew *et al.*, 1998). Σύμφωνα με τους Annison and Choct, (1992) αυτή η ποικιλομορφία πιθανόν να οφείλεται στη συγκέντρωση των μη αμυλωδών πολυσακχαριτών και κυρίως των αραβινοζυλάνων

για τις οποίες έχει αναφερθεί ότι δημιουργούν δυσμενείς συνθήκες στο λεπτό έντερο αυξάνοντας σε μεγάλο βαθμό το ιξώδες του περιεχομένου του επηρεάζοντας αρνητικά την πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής που περιέχουν στο βασικό τους σιτηρέσιο σιτάρι. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι, το σιτάρι λόγω της σύστασης του επιδρά επί της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας και πιο συγκεκριμένα ευνοεί την αύξηση πληθυσμών των γενών *Clostridium*, *Lactobacillus* καθώς και βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Kaldhusdal and Hofshagen, 1992; Choct *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2012). Η αύξηση των παραπάνω συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών πιθανόν να οφείλεται στο ότι, οι μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες του σιταριού αυξάνουν το χρόνο διέλευσης του περιεχομένου του εντέρου με άμεσο αποτέλεσμα να ευνοείται η βακτηριακή ανάπτυξη στο λεπτό έντερο (Choct *et al.*, 1996). Άλλες επιδράσεις των μη αμυλώδων πολυσακχαριτών, έχουν αναφερθεί στη μελέτη των Chen *et al.* (2016) στην οποία διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης προφλεγμονώδων κυτταροκινών, και ελάττωση της έκφρασης πρωτεϊνών στενού συνδέσμου όπως η οκλουδίνη (OCLN) και της βλεννοπρωτεΐνης 2 (MUC2) στο επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής και πάντα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές σε ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο με κύριο δημητριακό καρπό τον αραβόσιτο.

Οι παραπάνω συνέπειες, που αποτυπώνονται συνήθως επί της παραγωγικότητας των ορνιθίων και δημιουργούνται κυρίως εξαιτίας της σύστασης του σιταριού, αντιμετωπίζονται, με τη χορήγηση στο σιτηρέσιο των πτηνών, ενζύμων, όπως οι γλυκανάσες και οι ξυλανάσες οι οποίες έχει αναφερθεί ότι βελτιώνουν την πεπτικότητα του αμύλου, της πρωτεΐνης, και του λίπους ενώ βελτιώνουν και τη φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια (AME) στα σιτηρέσια με βασικό συστατικό το σιτάρι ή ακόμα και κριθάρι μειώνοντας το ιξώδες του εντερικού περιεχομένου (Hew *et al.*, 1998; Ravindran *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004).

Ο αραβόσιτος συνίσταται από 72% άμυλο, 4% λίπος και 10% πρωτεΐνη, η οποία υπολείπεται έναντι της αντίστοιχης του σιταριού (Ranum *et al.*, 2014). Η παγκόσμια παραγωγή σε αραβόσιτο για το 2003 δεν ξεπέρασε τους 630 εκατομμύρια τόνους (Cowieson *et al.*, 2005). με την αντίστοιχη παραγωγή για το 2011 να ξεπερνάει τους 840 εκατομμύρια τόνους (Lobel *et al.*, 2013), Παρόλο που η χρησιμοποίηση του αραβοσίτου για παραγωγή βιοαιθανόλης αποτελεί μια πιθανή αιτία, μια ίσως σημαντικότερη αιτία για την μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής του αραβοσίτου

κατά 62% συγκριτικά με την αντίστοιχη του σίτου την ίδια χρονική περίοδο (2003-2011) είναι η ολόενα και σε μεγαλύτερο ποσοστό χρησιμοποίησης του στη διατροφή των ζώων λόγω της υψηλότερης του διατροφικής αξίας (Cowieson *et al.*, 2005). Ωστόσο, η σύσταση του αραβοσίτου σε θρεπτικά συστατικά, όπως άμυλο, πρωτεΐνη, ινώδεις ουσίες, έλαια, αμινοξέα και ΑΜΕ ποικίλλει από ποικιλία σε ποικιλία, με την τελευταία να έχει αναφερθεί ότι διαφέρει περισσότερο ακόμα και από 2 MJ / kg (Cowieson *et al.*, 2005). Ο αραβόσιτος χορηγείται στο σιτηρέσιο των πτηνών κυρίως ως πηγή ενέργειας, αλλά συγχρόνως παρέχει περίπου το 20 % της πρωτεΐνης στο εναρκτήριο σιτηρέσιο, η οποία όμως από άποψης τρυπτοφάνης και θειούχων αμινοξέων (μεθειονίνη και κυστεΐνη) είναι σχετικά φτωχή (Peter *et al.*, 2000). Παρά την μικρή περιεκτικότητα του αραβοσίτου σε μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες, έχει εξεταστεί και η επίδραση της χορήγησης εξωγενών ενζύμων στα σιτηρέσια των πτηνών τα οποία βασίζονται σε αραβόσιτο και σογιάλευρο με σκοπό να διευκρινιστεί ο ρόλος τους αναφορικά με την επίδραση τους επί της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου, της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας και επί των αρνητικών επιδράσεων των αντιδιαιτητικών του παραγόντων (Cowieson *et al.*, 2005; Cowieson *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η σύσταση του σίτου και η παραλλακτικότητα της σύστασης του αραβοσίτου αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες που καθορίζουν τη σύσταση και τη διατροφική αξία ενός σιτηρεσίου. Ως εκ τούτου κρίνεται εξαιρετικά ενδιαφέρουσα όσο και αναγκαία η χορήγηση προσθέτων υλών όπως τα φυτοβιοτικά δηλαδή τα αιθέρια έλαια, τα συστατικά τους καθώς και τα μίγματα τους, σε σιτηρέσια που βασίζονται σε σίτο και αραβόσιτο με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του τύπου του σιτηρεσίου στην αποτελεσματικότητα της χορήγησης αυτών αλλά και αντίστροφα, κατά πόσο η χορήγηση των φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των ορνιθίων κρεοπαραγωγής επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης του καθένα από τους τύπους των βασικών σιτηρεσίων.

Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής πέραν των χρησιμοποιούμενων δημητριακών καρπών όπως του σιταριού και του αραβόσιτου που προαναφέρθηκαν, καθορίζεται και από τα επίπεδα της μεταβολιστέας ενέργειας (ME) και της ολικής πρωτεΐνης (ΟΠ). Αυτό έχει ως συνέπεια, τα τελευταία να επηρεάζουν άμεσα την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Η διατήρηση της υγείας αλλά και των

επιθυμητών παραγωγικών χαρακτηριστικών με ταυτόχρονη ελάττωση του κόστους της διατροφής αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους στην παραγωγή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Με αυτό το στόχο, τα τελευταία χρόνια, έχει πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός μελετών στις οποίες διερευνήθηκαν οι συνέπειες της επίδρασης διαφόρων επιπέδων μεταβολιστέας ενέργειας και πρωτεΐνης, στα σιτηρέσια των ορνιθίων κρεοπαραγωγής επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών (Aletor *et al.*, 2000; Berres *et al.*, 2010; Bravo *et al.*, 2011; Bregendahl *et al.*, 2002; Corzo *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2011; Houshmand *et al.*, 2012; Kamran *et al.*, 2004; Kamran *et al.*, 2008; Laudadio *et al.*, 2012; Neto *et al.*, 2000; Samadi and Frank Liebert., 2007; Smith *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 2008, Tabeidan *et al.*, 2005), της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών (Aletor *et al.*, 2000; Bravo *et al.*, 2011; Bregendahl *et al.*, 2002; Corzo *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009), των βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα (Tabeidan *et al.*, 2005; Steiner *et al.*, 2008) και της σύστασης του σώματος τους (Aletor *et al.*, 2000; Neto *et al.*, 2000; Berres *et al.*, 2010; Bregendahl *et al.*, 2002; Laudadio *et al.*, 2012). Επιπρόσθετα έχει διερευνηθεί σε σιτηρέσια των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, η αλληλεπίδραση πρόσθετων υλών όπως αμινοξέα κρυσταλλικής μορφής με διάφορα επίπεδα πρωτεΐνης (Bregendahl *et al.*, 2002, Samadi and Frank Liebert., 2007; Neto *et al.*, 2009), η προσθήκη πρωτεασών σε δύο διαφορετικά επίπεδα πρωτεΐνης και ενέργειας (Freitas *et al.*, 2011) καθώς επίσης και η προσθήκη εξωγενών ενζύμων σε διαφορετικά επίπεδα μεταβολιστέας ενέργειας (Zhou *et al.*, 2009).

Αναφορικά με την αλληλεπίδραση των φυτοβιοτικών με τα επίπεδα πρωτεΐνης και ενέργειας των σιτηρεσίων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, ο αριθμός των μελετών είναι περιορισμένος. Οι αρνητικές συνέπειες των χαμηλών επιπέδων ενέργειας και πρωτεΐνης στην διατροφή των πτηνών πιθανόν να δύναται να αντισταθμιστούν με τη χορήγηση στο σιτηρέσιο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής πρόσθετων υλών όπως τα φυτοβιοτικά δηλαδή τα αιθέρια έλαια, τα μίγματα και τα επιμέρους συστατικά τους. Στην μελέτη των Bravo *et al.* (2011) διερευνήθηκε σε δύο ξεχωριστά πειράματα η επίδραση επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών και της πεπτικότητας στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, ενός μίγματος αιθέριων ελαίων με κύρια συστατικά την καρβακρόλη, την κινναμαλδεύδη και την ελαιορητίνη το οποίο χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100 mg / kg της τροφής σε σιτηρέσια βασισμένα σε αραβόσιτο και σογιάλευρο σε συνδυασμό με δύο επίπεδα μεταβολιστέας ενέργειας χωρίς όμως τη διατήρηση σταθερού του λόγου ενέργειας προς πρωτεΐνη. Στην

παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε, πως η χορήγηση του προαναφερθέντος μίγματος αιθέριων ελαίων αντιστάθμισε τις αρνητικές συνέπειες της ελάττωσης της μεταβολιστέας ενέργειας του σιτηρεσίου κατά 2 % επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Οι Kamran *et al.* (2008), πραγματοποίησαν πείραμα με σταθερό λόγο ενέργεια (ME) προς πρωτεΐνη (ΟΠ) στο οποίο μελέτησαν την επίδραση σιτηρεσίων χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών και της ποιότητας του σφαγίου αλλά παρόλα αυτά, χωρίς την προσθήκη φυτοβιοτικού. Σκοπός της προαναφερθείσας μελέτης, ήταν να διαπιστωθεί αν οι χαμηλές παραγωγικές αποδόσεις που προκαλούνται από σιτηρέσια χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη δύναται να βελτιωθούν ύστερα από χορήγηση σιτηρεσίου με σταθερό λόγο ME προς ΟΠ. Επιπρόσθετα, οι Kamran *et al.* (2008), επισημαίνουν την έλλειψη δεδομένων στη βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση και τις επιδράσεις σιτηρεσίου με ελαττωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και σταθερό λόγο ME προς ΟΠ στην διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται, η ύπαρξη κενού στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη μελέτη της επίδρασης της διατήρησης σταθερού λόγου ME προς ΟΠ σε σιτηρέσια ορνιθίων με μειωμένα επίπεδα ME και ΟΠ σε συνδυασμό ή μη με την προσθήκη φυτοβιοτικού. Δημιουργείται λοιπόν, η αναγκαιότητα της διερεύνησης των πιθανών ευεργετικών επιδράσεων που μπορεί να έχει η προσθήκη φυτοβιοτικού, επί των αρνητικών αποτελεσμάτων που αναμένονται σε επίπεδο παραγωγικότητας, ποιότητας κρέατος αλλά και στον οργανισμό του ορνιθίου ύστερα από χορήγηση σιτηρεσίων με χαμηλότερα των συνιστώμενων επιπέδων ME και ΟΠ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

2.1 Μεταβολισμός βιοενεργών συστατικών φυτοβιοτικών

Η απορρόφηση των βιοενεργών συστατικών των φυτοβιοτικών, όπως αναφέρεται στη μελέτη των Brenes and Roura (2010), αναφέρεται ότι πραγματοποιείται άμεσα ύστερα από χορήγηση, στοματική, ανώτερη αναπνευστική (εισπνοή), παρεντερική ή από το δέρμα, ενώ στη συνέχεια μεταβολίζονται στο ήπαρ και καταλήγουν στη μορφή των γλυκουρονιδίων ή αποβάλλονται ως CO₂. Παρόλα αυτά, η απορρόφησή τους κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα μπορεί να εξαρτάται και από το είδος του συστατικού των αιθέριων ελαίων. Για παράδειγμα η καρβακρόλη, η θυμόλη, η ευγενόλη και η trans- κινναμαλδεύδη έχει διαπιστωθεί ότι απορροφήθηκαν κυρίως στο στομάχι και στο εγγύς λεπτό έντερο χοιριδίων και ανεξάρτητα από το μεταβολισμό που λαμβάνει χώρα στον κάθε ξενιστή, φαίνεται απίθανο η εντερική μικροχλωρίδα να συμμετέχει στη διαδικασία αποδόμησης και μεταβολισμού τους (Michiels *et al.*, 2008). Ωστόσο, σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών όπως για παράδειγμα η κερκετίνη, φτάνουν στο παχύ έντερο διότι ο ρυθμός απορρόφησης τους στο λεπτό έντερο αναφέρεται ως χαμηλός (Suzuki and Hara. 2011). Επίσης, στη μελέτη των Aura *et al.* (2002) διαπιστώθηκε πως η μικροβιακή χλωρίδα του παχέος εντέρου παρουσιάζει την ικανότητα να μετατρέπει τα φλαβονοειδή σε χαμηλότερου μοριακού βάρους φαινόλες οι οποίες μπορεί να εμφανίζουν θετικές βιολογικές επιδράσεις στο εντερικό του περιεχόμενο. Επιπλέον, σε είδη πτηνών έχει διαπιστωθεί ότι υπολείμματα ουρικού αναρρέουν πίσω στο τυφλό έντερο (Sacranie *et al.*, 2012). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα μη απορροφηθέντα συστατικά των αιθέριων ελαίων και οι μεταβολίτες τους στα ούρα πιθανόν να ασκούν επίδραση επί της μικροβιακής χλωρίδας στα τυφλά έντερα των πτηνών (Paraskeuas and Mountzouris, 2019 in press).

Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι, η αποτελεσματικότητα της χορήγησης των αιθέριων ελαίων στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ταχύτητα της απορρόφησης τους και από την δυνατότητα αποδόμησης τους στο εντερικό περιεχόμενο οι οποίοι δύνανται να αυξάνουν ή να ελαττώνουν την διαθεσιμότητα τους στη μικροβιακή μικροχλωρίδα, με άμεση συνέπεια να απαιτείται εκτενέστερη μελέτη επί της βέλτιστης δοσολογίας τους, επιλογής του είδους των χορηγηθέντων συστατικών τους και της καταλληλότερης τεχνικής και τρόπου χορήγησης τους (Michiels *et al.*, 2016).

2.2 Επίδραση των φυτοβιοτικών επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των παχυνόμενων ορνιθίων

Η επίδραση των φυτοβιοτικών επί των ζωοτεχνικών παραμέτρων όπως η κατανάλωση της τροφής (Κ.Τ.), ο ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους (Ρ.Α.Σ.Β.) και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (Σ.Ε.Τ.), έχει αποτελέσει αντικείμενο διερεύνησης σε μεγάλο αριθμό μελετών όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2.1.**, όπου ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες χαρακτηριστικές εργασίες της βιβλιογραφίας ενώ ταυτόχρονα δίνονται πληροφορίες για τη δοσολογία αλλά και τον τύπο των συστατικών του βασικού σιτηρεσίου.

Πίνακας 2.1 Επίδραση των φυτοβιοτικών επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των παχυνόμενων ορνιθίων

Βιβλιογραφική αναφορά	Φυτοβιοτικό	-Συγκέντρωση	Κ.Τ. ¹	Ρ.Α.Σ.Β. ²	Σ.Ε.Τ. ³
	- Βασικό Σιτηρέσιο				
Lee <i>et al.</i>, 2003	Αιθέρια έλαια	θυμόλης,	-	-	-
	κιναμαλδεύδης,				
	100 mg/kg τροφής				
	Αραβόσιτος -Σογιάλευρο				
Hernandez <i>et al.</i>, 2004	M.A.E. ⁴ φασκόμηλου,		-	↑	-
	θυμαριού, δενδρολίβανου				
	5000 ppm, Αραβόσιτος	-			

Σιτάρι-Σογιάλευρο				
Basmacioglu	Αιθέριο έλαιο ρίγανης,	-	↑	-
Malayoglu et al., 2010	250, 500 mg/kg τροφής, Σιτάρι-Σογιάλευρο			
Cao et al., 2010	M.A.E. κινναμαλαδεύδης, θυμόλης, 100 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	-	-
Amad et al., 2011	M.A.E. θυμαριού, γλυκάνισου, 150, 750, 1500 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σιτάρι- Σογιάλευρο	-	-	↓
Amerah et al., 2011	M.A.E. με κύρια συστατικά κινναμαλαδεύδη, θυμόλη, 100 mg/kg τροφής, Σιτάρι-Σογιάλευρο	-	↑	-
Mountzouris et al., 2011	M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου, φλοιού εσπεριδοειδών, 80, 125, 250 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	↓	↑	↓
Rahimi et al., 2011	Αιθέρια έλαια σκόρδου, θυμαριού, εχινάκειας ή μίγματος αυτών, 0.1 % επί της τροφής, Αραβόσιτος-Σιτάρι- Σογιάλευρο	-	↓	↑
Emami et al., 2012	Αιθέριο έλαιο μέντας 200,400 mg/kg τροφής Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	-	↓ (200mg/kg)
Hong et al., 2012	M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου, φλοιού εσπεριδοειδών, 125 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	-	↓
Hashemipour	M.A.E. καρβακρόλης,	↓	↑	↓

et al., 2013	θυμόλης, 0, 60, 100, 200 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο				
Bravo et al., 2014	M.A.E. καρβακρόλης, κινναμαλαδεύδης, κοκκινοπίπερου 100 mg/kg τροφής Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	↑	↓	
Cho et al., 2014	M.A.E. θυμαριού, γλυκάνισου, 250 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	-	↓	
Hassan et al., 2015	Αιθέρια έλαια αγκινάρας 150 mg/kg Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	↑	↓	
Wati et al., 2015	M.A.E. μάραθου, μέντας, γαρύφαλλου, γλυκάνισου, θυμαριού , 150 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο	-	↑	↓	
Du et al., 2016	M.A.E. θυμόλης και καρβακρόλης, 0, 60, 120, 240 mg/kg τροφής, Σιτάρι-Σογιάλευρο	-	-	↓ ($P \leq 0.10$)	
Franciosini et al., 2016	Αιθέρια έλαια ρίγανης, δενδρολίβανου ή μίγματος αυτών, 2 g/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σιτάρι-Σογιάλευρο	-	↑	-	
Hafeez et al., 2016	M.A.E. με συστατικά μενθόλη/ανηθόλη (MA150mg/kg) + μίγμα αιθέριων ελαίων με συστατικά καρβακρόλη/θυμόλη/λεμονένιο	-	↑ (MA 150)	↓ (MA 150) (ΚΘΛ 100)	

		(ΚΘΛ100mg/kg)			
		Αραβόσιτος-Σιτάρι- Σογιάλευρο			
Hashemipour et al., 2016	M.A.E.	καρβακρόλης, θυμόλης, 0, 100, 200 mg/ kg τροφής, Σιτάρι-Σογιάλευρο	-	↑	↓
Paraskeuas et al., 2016	Μίγμα αιθέριων ελαίων ρίγανης, γλυκάνισου, φλοιού εσπεριδοειδών, 125 mg/kg τροφής, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο		-	-	↓ ($P \leq 0.10$)
Paraskeuas et al., 2017a	M.A.E. με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη, Αραβόσιτος-Σογιάλευρο		-	↑	↓
Paraskeuas et al., 2017b	M.A.E. με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη, Σιτάρι-σογιάλευρο		↓	↑	↓

¹ Κ.Τ.: κατανάλωση τροφής

² Ρ.Α.Σ.Β.: ρυθμός αύξησης σωματικού βάρους

³ Σ.Ε.Τ.: συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής

⁴ Μ.Α.Ε.: Μίγμα αιθέριων ελαίων

Αναφορικά με την Κ.Τ., των παχυνόμενων ορνιθίων, παρατηρούμε πως στην πλειοψηφία των μελετών που εξετάστηκαν (20 στις 22), δεν εντοπίστηκε επίδραση των φυτοβιοτικών επί του προαναφερθέντος παράγοντα. Παρόλα αυτά, σε δύο μελέτες (Mountzouris et al., 2011; Hashemipour et al., 2013) στις οποίες χρησιμοποιήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο, η προσθήκη μιγμάτων αιθέριων ελαίων που περιείχαν κυρίως συστατικά της ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε συγκεντρώσεις προσθήκης οι οποίες κυμάνθηκαν από 0 έως 250 mg / kg, μείωσαν την Κ.Τ. των παχυνόμενων ορνιθίων. Στον **Πίνακα 2.1**, παρατηρείται αυξητική επίδραση των αιθέριων ελαίων και των μιγμάτων τους επί του

P.A.Σ.B. των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, σε ποσοστό 59% (13 στις 22) των μελετών που παρουσιάζονται, σε ποικίλες συγκεντρώσεις και ανεξάρτητα από τον χρησιμοποιούμενο δημητριακό καρπό στο βασικό σιτηρέσιο. Στις υπόλοιπες μελέτες που εξετάστηκαν, τα εφαρμοζόμενα στη διατροφή των παχυνόμενων ορνιθίων φυτογενή συστατικά, δεν επέδρασαν επί του P.A.Σ.B. (9 στις 22), ενώ επιπρόσθετα στη μελέτη των Rahimi *et al.* (2011), παρουσιάστηκε μείωση του P.A.Σ.B., με προσθήκη αιθέριων ελαίων εχινάκειας (*Echinacea purpurea*) σε συγκέντρωση 0.1 % επί του σιτηρεσίου.

Η προσθήκη των φυτοβιοτικών, φαίνεται να βελτιώνει τον Σ.Ε.Τ. των παχυνόμενων ορνιθίων, στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων μελετών και σε ποσοστό επίσης πάνω από 68% (15 από τις 22), ενώ η επίδραση αυτή δείχνει να οφείλεται κυρίως στην βελτίωση του P.A.Σ.B., και λιγότερο στην ελάττωση της Κ.Τ. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται, από την παρατήρηση ότι, στις περισσότερες μελέτες, όπου εντοπίστηκε επίδραση των αιθέριων ελαίων και των μιγμάτων τους επί του P.A.Σ.B. βελτιώθηκε επίσης και ο Σ.Ε.Τ. (Mountzouris *et al.*, 2011; Hashemipour *et al.*, 2013; Bravo *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2015; Wati *et al.*, 2015; Hafeez *et al.*, 2016; Hashemipour *et al.*, 2016; Pasaskeuas *et al.*, 2017a). Στη μοναδική περίπτωση που παρατηρήθηκε ελάττωση του P.A.Σ.B. των παχυνόμενων ορνιθίων (Rahimi *et al.*, 2011), ύστερα από προσθήκη αιθέριων ελαίων εχινάκειας (*Echinacea purpurea*), παρατηρήθηκε αύξηση του Σ.Ε.Τ. άρα και χειροτέρευση του.

Στην μελέτη των Hernandez *et al.* (2004) αναφέρεται ότι, οι επιδράσεις των φυτοβιοτικών επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών και κυρίως του ΣΕΤ της τροφής, πιθανόν να οφείλονται, στην βελτίωση της αποτελεσματικότητας χρησιμοποίησης των θρεπτικών συστατικών της τροφής από τα ορνίθια, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης τους. Επιπρόσθετα, όπως θα δούμε και στα παρακάτω κεφάλαια, υπάρχουν αποτελέσματα σε μεγάλο αριθμό μελετών που συνδέουν τα φυτοβιοτικά με ευεργετικές επιδράσεις επί της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών και της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, παράγοντες οι οποίοι δύναται διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μέγιστη αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών άρα και σε αύξηση της παραγωγικότητας και ανάπτυξης των ορνιθίων (Lee *et al.*, 2003; Huyghebaert, *et al.*, 2011) της πεπτικότητας. Συμπερασματικά, από τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τον **Πίνακα 2.1.**, καταλήγουμε πως η επίδραση των φυτοβιοτικών εντοπίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό

επί της βελτίωσης του P.A.Σ.B, και σε μικρότερο βαθμό επί της ελάττωσης της K.T., με άμεσες συνέπειες επί του Σ.Ε.Τ. των παχυνόμενων ορνιθίων, του οποίου βελτίωση παρατηρείται στην πλειοψηφία των μελετών και οι μεταβολές του εξαρτώνται άμεσα από τους 2 παραπάνω παράγοντες.

Τέλος, σκόπιμο είναι να αναφερθεί πως οι ευεργετικές επιδράσεις των προστιθέμενων φυτοβιοτικών στο σιτηρέσιο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών και ο γενικότερος ρόλος τους ως παράγοντας αύξησης της παραγωγικής τους απόδοσης, έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται και από παράγοντες όπως η κατάλληλη συγκέντρωση χορήγησης στο σιτηρέσιο, η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου καθώς επίσης η ζωοτεχνική διαχείριση και οι εφαρμοζόμενες συνθήκες εκτροφής (Marcinakova *et al.*, 2011).

2.3 Φυτοβιοτικά και πεπτικότητα

Μια από τις κύριες ιδιότητες των φυτοβιοτικών όπως παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία αποτελεί η ευεργετική επίδραση τους επί της πεπτικότητας των συστατικών των σιτηρεσίων στα παχυνόμενα ορνίθια (Brenes and Roura., 2010). Έχει αναφερθεί βελτίωση της ειλεακής πεπτικότητας της ξηράς ουσίας (Jamroz *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2010), των αζωτούχων ουσιών (Jamroz *et al.*, 2003; Amad *et al.*, 2011; Hafeez *et al.*, 2016), των λιπαρών ουσιών (Jamroz *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2010; Amad *et al.*, 2011) και της ενέργειας (Cao *et al.*, 2010), ύστερα από προσθήκη στο σιτηρέσιο των παχυνόμενων ορνιθίων μιγμάτων αιθέριων ελαίων (M.A.E.) με κύρια συστατικά μεταξύ άλλων μενθόλη, ανηθόλη, κινναμαλδεύδη, θυμόλη αλλά και αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών όπως θυμαριού και γλυκάνισου όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2.2.**

Πίνακας 2.2 Επίδραση φυτοβιοτικών στην ειλεακή πεπτικότητα

Βιβλιογραφική αναφορά	Φυτοβιοτικό	Ξ.Ο. ¹	Ο.Ο. ²	Α.Ο. ³	Λ.Ο. ⁴	Σ.Ε. ⁵
Jamroz et al., 2003	M.A.E. ⁶ με συστατικά κινναμαλαδεύδη, θυμόλη	↑	Δ.Μ. ⁷	↑	↑	-
Cao et al., 2010	M.A.E. με συστατικά κινναμαλαδεύδη, θυμόλη	↑	Δ.Μ. *	-	↑	↑
Amad et al., 2011	M.A.E. θυμαριού, γλυκάνισου	Δ.Μ.	Δ.Μ.	↑	↑	Δ.Μ.
Amerah et al., 2011	M.A.E. με συστατικά κινναμαλαδεύδη, θυμόλη	Δ.Μ.	↑	-		-
Hafeez et al., 2016	M.A.E. με συστατικά μενθόλη/ανηθόλη + μίγμα αιθέριων ελαίων με συστατικά καρβακρόλη/θυμόλη/λεμονένιο	-	Δ.Μ.	↑	-	Δ.Μ.

¹ Ξ. Ο.: Ξηρά ουσία

² Ο. Ο.: Οργανική ουσία

³ Α. Ο.: Αζωτούχες ουσίες

⁴ Λ. Ο.: Λιπαρές ουσίες

⁵ Σ. Ε.: Συνολική ενέργεια

⁶ Μ. Α. Ε.: Μίγμα αιθέριων ελαίων

⁷ Δ. Μ.: Δεν μετρήθηκε

Επιπρόσθετα, αιθέρια έλαια γλυκάνισου, φλοιού εσπεριδοειδών, θυμαριού, μέντας και αγγινάρας αλλά και Μ.Α.Ε. με κύρια συστατικά θυμόλη, καρβακρόλη, λεμονένιο και κινναμαλαδεύδη έχει αναφερθεί ότι βελτιώνουν την ολική πεπτικότητα της ξηράς ουσίας (Cho *et al.*, 2014; Paraskeuas *et al.*, 2017a), της οργανικής ουσίας (Mountzouris *et al.*, 2011), των αζωτούχων ουσιών (Khodambashi Emami *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2015), των λιπαρών ουσιών (Pirgozliev *et al.*, 2015; Paraskeuas *et al.*, 2016), της φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένης

για το άζωτο (Mountzouris *et al.*, 2011; Pirgozliev *et al.*, 2015; Paraskeuas *et al.*, 2017a) και συνολικής ενέργειας (Cho *et al.*, 2014), όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2.3**.

Πίνακας 2.3 Επίδραση φυτοβιοτικών στην ολική πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και τη φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια της τροφής

Βιβλιογραφική αναφορά	Φυτοβιοτικό	Ξ.Ο. ¹	Ο.Ο. ²	Α.Ο. ³	Λ.Ο. ⁴	ΑΜΕn ⁵	Σ.Ε. ⁶
Mountzouris <i>et al.</i>, 2011	M.A.E. ⁷ ρίγανης, γλυκάνισου και εσπεριδοειδών	-	↑	-	-	↑	Δ.Μ. ⁸ *
Khodambashi Emami <i>et al.</i>, 2012	Αιθέριο έλαιο μέντας	-	Δ.Μ.	↑	-	Δ.Μ.	-
Cho <i>et al.</i>, 2014	M.A.E. θυμαριού, γλυκάνισου	↑	-	↑	-	Δ.Μ.	↑
Pirgozliev <i>et al.</i>, 2015	M.A.E. καρβακρόλης, κινναμαλαδεύδης	-	Δ.Μ.	-	↑	↑	Δ.Μ.
Hassan <i>et al.</i>, 2015	Αιθέρια έλαια αγκινάρας	↓	-	↑	-	Δ.Μ.	Δ.Μ.
Paraskeuas <i>et al.</i>, 2016	M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου, εσπεριδοειδών	-	-	-	↑	-	Δ.Μ.
Paraskeuas <i>et al.</i>, 2017a	M.A.E. με συστατικά μενθόλη/ανηθόλη/ευγενόλη	↑	Δ.Μ.	-	-	↑	Δ.Μ.
Paraskeuas <i>et al.</i>, 2017b	M.A.E. με συστατικά μενθόλη/ανηθόλη/ευγενόλη	-	-	-	-	-	Δ.Μ.

¹ Ξ. Ο.: Ξηρά ουσία

² Ο. Ο.: Οργανική ουσία

³ Α. Ο.: Αζωτούχες ουσίες

⁴ Λ. Ο.: Λιπαρές ουσίες

⁵ ΑΜΕ_n: Φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια διορθωμένη ως προς το άζωτο

⁶ Σ. Ε.: Συνολική ενέργεια

⁷ Μ. Α. Ε.: Μίγμα αιθέριων ελαίων

⁸ Δ. Μ.: Δεν μετρήθηκε

Στην μελέτη των Hashemi *et al.* (2010) αναφέρεται ότι, οι ευεργετικές επιδράσεις των φυτοβιοτικών, επί της πεπτικότητας των συστατικών της τροφής του σιτηρεσίου, πιθανόν να οφείλονται σε διάφορους λόγους όπως, ότι αποτελούν παράγοντες ρύθμισης της πεπτικής λειτουργίας του οργανισμού των ορνιθίων, λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων, της αύξησης της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων και της αύξησης της ακεραιότητας και του ύψους των εντερικών λαχνών που αποτελούν συνέπειες της χορήγησής τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων. Παρόλα αυτά ο ακριβής τρόπος δράσης των φυτοβιοτικών που έχει ως αποτέλεσμα τις προαναφερθείσες ευεργετικές επιδράσεις επί της πεπτικότητας των συστατικών της τροφής δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί και μελετάται η πιθανή συσχέτισή του με παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική ακεραιότητα, την μεταφορά των θρεπτικών συστατικών καθώς επίσης και την ανοσοβιολογική απόκριση στο γαστρεντερικό περιβάλλον σε μοριακό επίπεδο. Τέλος, βελτιώσεις στην παραγωγική απόδοση των ορνιθίων από την χορήγηση φυτοβιοτικών πιθανόν να μπορούν να συνδέονται με την αύξηση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών από την προσθήκη τους, καθώς βελτίωση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών της τροφής μέσω της αύξησης της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων από τα φυτοβιοτικά έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αποτελέσει την κύρια αιτία βελτίωσης του ΣΕΤ (Nobakht *et al.*, 2012).

2.4 Επίδραση φυτοβιοτικών σε βιοχημικές παραμέτρους στο αίμα

Οι επιδράσεις των αιθέριων ελαίων, των μιγμάτων τους, των επιμέρους συστατικών τους και άλλων φυτοβιοτικών επί των βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα έχει διερευνηθεί σε αρκετές επιστημονικές εργασίες τα τελευταία χρόνια. Αναφορικά με την επίδρασή τους επί της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα παρατηρείται

μεγάλη ποικιλομορφία αποτελεσμάτων. Όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.4.**, σε κάποιες περιπτώσεις η προσθήκη φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των παχυνόμενων ορνιθίων ελαττώνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης (Khaksar *et al.*, 2012; Abou-Ekhair *et al.*, 2014; Akbari *et al.*, 2014; Alzawqari *et al.*, 2016) σε άλλες την αυξάνει (Nobakht *et al.*, 2011; Paraskeuas *et al.*, 2017a) ενώ τέλος σε άλλες μελέτες δεν την επηρεάζει (Safamehr *et al.*, 2012; Fallah *et al.*, 2013; Khattak *et al.*, 2014; Paraskeuas *et al.*, 2017b). Παρόμοια ποικιλομορφία στα αποτελέσματα παρουσιάζει η επίδραση της προσθήκης των φυτοβιοτικών στη διατροφή των παχυνόμενων ορνιθίων και επί της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης όπου σε άλλες περιπτώσεις αυξάνεται (Zhang *et al.*, 2013; Abou-Ekhair *et al.*, 2014; Alzawqari *et al.*, 2016) σε άλλες μειώνεται (Hosseini *et al.*, 2013), ενώ στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν επηρεάζεται (Toghyani *et al.*, 2010; Nobakht *et al.*, 2011; Ghalamkari *et al.*, 2011; Safamehr *et al.*, 2012; Fallah *et al.*, 2013; Latif *et al.*, 2013; Khattak *et al.*, 2014; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a; Paraskeuas *et al.*, 2017b). Αυτή η ποικιλομορφία των αποτελεσμάτων αναφορικά με την επίδραση της προσθήκης των φυτοβιοτικών επί των βιοχημικών παραμέτρων της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης και της γλυκόζης στο αίμα πιθανόν να οφείλεται μεταξύ άλλων στα επιμέρους συστατικά τους, στην εφαρμοζόμενη δοσολογία σε κάθε περίπτωση αλλά και στην συνολική κατανάλωση τροφής από τα πτηνά (Toghyani *et al.*, 2010).

Επίσης, όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.4.**, στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων μελετών έχει διαπιστωθεί ότι τα φυτοβιοτικά προκαλούν μείωση της συγκέντρωσης της ολικής χοληστερόλης (Hong *et al.*, 2012; Khaksar *et al.*, 2012; Safamehr *et al.*, 2012; Fallah *et al.*, 2013; Hosseini *et al.*, 2013; El-Latif *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014; Alzawqari *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a) στο αίμα. Η μείωση αυτής της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος που παρατηρείται από την προσθήκη των φυτοβιοτικών στη διατροφή των πτηνών, πιθανόν να οφείλεται στην ελάττωση της δράσης του ενζύμου HMG-Co A αναγωγάσης από συστατικά των προστιθέμενων ελαίων όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη (El-Ghousein *et al.*, 2009; Hayati *et al.*, 2011). Το ένζυμο αυτό έχει καθοριστικό ρόλο επί της ρύθμισης της παραγωγής χοληστερόλης καθώς είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του μεβαλονικού οξέος το οποίο μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της χοληστερόλης (Paraskeuas *et al.*, 2016). Επιπρόσθετα στη μελέτη των Ciftci *et al.* (2010) αναφέρεται πως η

παρεμπόδιση του ενζύμου HMG-Co A αναγωγάσης ελαττώνει την σύνθεση χοληστερόλης σε αρκετά είδη ζώων συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Παρόμοια ελάττωση από την προσθήκη φυτοβιοτικών στο σιτηρέσιο των πτηνών παρατηρείται και για τα τριγλυκερίδια στο πλάσμα του αίματος (Khaksar *et al.*, 2012; Safamehr *et al.*, 2012; Fallah *et al.*, 2013; Hosseini *et al.*, 2013; El- Latif *et al.*, 2013; Abou-Ekhair *et al.*, 2014; Akbari *et al.*, 2014; Alzawqari *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017b). Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στη διατροφή των παχυνόμενων ορνιθίων έχει διαπιστωθεί ότι προκαλείται κυρίως λόγω της επίδρασης συγκεκριμένων επιμέρους συστατικών τους επί της δράσης του ενζύμου HMG-CoA αναγωγάσης που προαναφέρθηκε και για την ολική χοληστερόλη καθώς και επί της επίδρασής τους επί της λιπογένεσης (Lee *et al.*, 2003).

Πίνακας 2.4 Επίδραση φυτοβιοτικών σε βιοχημικές παραμέτρους στο αίμα

Βιβλιογραφική αναφορά	Φυτοβιοτικό	Γλυκόζη	Πρωτεΐνη	Ολική Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια
Toghyani <i>et al.</i>, 2010	Άλεσμα θυμαρίου	Δ.Μ. ¹	-	-	-
Nobakht <i>et al.</i>, 2011	Άλεσμα Μέντας	↑ (2%>1,5 and 1%)	-	-	-
Ghalamkari <i>et al.</i>, 2011	Άλεσμα θρούμπι	Δ.Μ.	-	-	-
Hong <i>et al.</i>, 2012	M.A.E. ² ρίγανης, γλυκάνισου, εσπεριδοειδών	Δ.Μ.	Δ.Μ.	↓	Δ.Μ.
Khaksar <i>et al.</i>, 2012	Αιθέριο έλαιο Θυμαριού	↓	Δ.Μ.	↓	↓
Safamehr <i>et al.</i>, 2012	Αποξηραμένα φύλλα Τσουκνίδας	-	-	↓	↓
Fallah <i>et al.</i>, 2013	Αιθέριο έλαιο Μέντας	-	-	↓	↓

Hosseini et al., 2013	Αιθέριο Θυμαριού	έλαιο	Δ.Μ.	↓	↓	↓
El-Latif et al., 2013	Αιθέρια δενδρολίβανου και σκόρδου	έλαια	Δ.Μ.	-	↓	↓
Zhang et al., 2013	Άλεσμα Astragalus (Astragalus membranaceus)		Δ.Μ.	↑	↓	Δ.Μ.
Abou-Ekhair et al., 2014	Μίγμα πιπεριού, σπόρων κόλιανδρου και αλέσματος κουρκουμά	μαύρου	↓	↑	-	↓
Akbari et al., 2014	Αιθέριο έλαιο Μέντας		↓	Δ.Μ.	-	↓
Khattak et al., 2014	M.A.E. θυμαριού, ρίγανης, βασιλικού, φασκόμηλου, κύμινου και λεμονιού		-	-	-	Δ.Μ.
Cho et al., 2014	M.A.E. θυμαριού, γλυκάνισου		Δ.Μ.	Δ.Μ.	↓	-
Alzawqari et al., 2016	Μίγμα αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού και φύλλων λεμονιάς		↓	↑	↓	↓
Paraskeuas et al., 2016	M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών		Δ.Μ.	-	↓	-
Paraskeuas et al., 2017a	M.A.E. με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη		↑ ($P \leq 0.10$)	-	↓ ($P \leq 0.10$)	-
Paraskeuas et al., 2017a	M.A.E. με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη		-	-	-	↓

¹ Δ.Μ.: Δεν μετρήθηκε

Συμπερασματικά, καταλήγουμε στο ότι, η προσθήκη φυτοβιοτικών στη διατροφή των παχυνόμενων ορνιθίων, ελαττώνει στις περισσότερες περιπτώσεις τη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα των πτηνών με πιθανή αιτία την επίδραση των επιμέρους συστατικών τους επί της δράσης του ενζύμου HMG-CoA το οποίο συμμετέχει στη σύνθεση της χοληστερόλης από μεβαλονικό οξύ καθώς και σε διαδικασίες λιπογένεσης. Τέλος, τα αποτελέσματα της επίδρασης των αιθέριων ελαίων και άλλων φυτοβιοτικών, επί της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης και της γλυκόζης στο αίμα των παχυνόμενων ορνιθίων παρουσιάζουν μια ποικιλομορφία η οποία πιθανόν οφείλεται όπως προαναφέρθηκε μεταξύ άλλων, στη συμμετοχή των επιμέρους συστατικών τους στο εκάστοτε μείγμα, στην εφαρμοζόμενη δοσολογία αλλά και στην κατανάλωση τροφής από τα πτηνά.

2.5 Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών

Η οξείδωση του λίπους, είναι μια διαδικασία ιδιαίτερα σημαντική για την βιομηχανία τροφίμων καθώς τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα οξειδώνονται επηρεάζοντας έτσι την εμφάνιση, τη γεύση, τη θρεπτική αξία αλλά και τη συνολική ποιότητα των προϊόντων (Khan *et al.*, 2012). Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός αντιοξειδωτικών ουσιών προερχόμενων από φυτικά προϊόντα έχουν μελετηθεί και ανάμεσά τους τα αιθέρια έλαια είναι αυτά που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποτελεσματικές για στην καθυστέρηση της οξείδωσης του λίπους του κρέατος, με άμεσο αποτέλεσμα να προσελκύσουν το ενδιαφέρον πολλών επιστημονικών ομάδων (Brenes and Roura, 2010).

Η χημική δομή των φυτοβιοτικών και ιδιαίτερα των αιθέριων ελαίων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Στη μελέτη των Brenes and Roura. (2010) αναφέρεται, πως η παρουσία φαινολικών OH ομάδων είναι η αιτία της υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης της θυμόλης, γεγονός το οποίο αναδεικνύει την υψηλή συσχέτιση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των αιθέριων ελαίων με τη χαμηλή οξείδωση του λίπους στο κρέας. Επιπρόσθετα, στη μελέτη των Falowo *et*

al., (2014) αναφέρεται ότι τα φαινολικά συστατικά είναι αυτά που διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην καθυστέρηση της οξειδωσης στον οργανισμό των ζώων είτε στο αίμα, είτε στο κρέας και το ήπαρ είτε στο εντερικό επιθήλιο, που αποτελούν τους κυρίως εξεταζόμενους ζωικούς ιστούς για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Τέλος, η αντιοξειδωτική δράση των φυτοβιοτικών έχει αναφερθεί ότι οφείλεται και σε φαινυλοπροπενοειδή όπως για παράδειγμα το ροσμαρινικό οξύ, το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) κ.ά., καθώς επίσης σε άλλες περιπτώσεις και σε μονοτερπένια όπως η θυμόλη και η καρβακρόλη που αποτελούν κύρια συστατικά αρωματικών φυτών όπως το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και η ρίγανη (*Origanum vulgare*) και εμφανίζουν υψηλά ποσοστά φαινολικών -OH ομάδων (Hong *et al.*, 2012).

Οι κύριες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών αντιοξειδωτικών και των συστατικών τους που εφαρμόζονται στους παραπάνω ιστούς είναι ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με την υδρόφιλη ή λιπόφιλη μέθοδο O.R.A.C. (oxygen radical absorbance capacity) (Hoffman-Pennesi and Wu., 2010; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a; Paraskeuas *et al.*, 2017b) με τη μέθοδο ELISA (Alzawqari *et al.*, 2016), με δέσμευση ελεύθερων ριζών με μέθοδο DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Jang *et al.*, 2008; Roofchae *et al.*, 2011), με προσδιορισμό της συγκέντρωσης της μηλονικής διαλδεϋδης (Faix *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Ciftci *et al.*, 2010; Akbarian *et al.*, 2014) και με μεθόδους μέτρησης ενώσεων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (μέθοδος TBARS), (Jang *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2010; Marcincakova *et al.*, 2011; Akbarian *et al.*, 2014). Επίσης, εκτίμηση για την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτοβιοτικών πραγματοποιείται και με μέτρηση της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (Faix *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Ciftci *et al.*, 2010; Hashemipour *et al.*, 2013; Akbarian *et al.*, 2014), η υπεροξειδική δεισμουτάση (SOD) (Faix *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Hashemipour *et al.*, 2013), καταλάση (CAT) (Ciftci *et al.*, 2010) είτε με βιοχημικές μεθόδους, είτε με μοριακές μεθόδους προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης mRNA αντιοξειδωτικών παραγόντων και ενζύμων με την αναλυτική τεχνική της αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου - Real Time PCR (Akbarian *et al.*, 2014).

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά όπως τα αιθέρια έλαια, εφαρμόζονται είτε ως πρόσθετα στη διατροφή των παχυνόμενων ορνιθίων είτε με τεχνικές προσθήκης απευθείας στο

κρέας με στόχο και στις δύο περιπτώσεις την ελάττωση ή ακόμα και την αποφυγή της οξειδωτικής διαδικασίας στα προϊόντα κρέατος (Fasseas et al., 2008; Falowo *et al.*, 2014). Τα αποτελέσματα και οι επιμέρους επιδράσεις της προσθήκης αλεσμάτων αρωματικών φυτών, των αιθέριων ελαίων τους, των μιγμάτων τους και των συστατικών τους παρουσιάζονται στους **Πίνακες 2.5** και **2.6**, και αφορούν την καθυστέρηση της οξείδωσης του λίπους στο πλάσμα του αίματος και στο κρέας, στο ήπαρ και στο εντερικό επιθήλιο παχυνόμενων ορνιθίων. Σε αυτό το σημείο, πρέπει να τονισθεί ότι η συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά συστατικά στα φυτά ποικίλλει με άμεσο αποτέλεσμα οι εφαρμοζόμενες δοσολογίες χορήγησης στα σιτηρέσια των παχυνόμενων ορνιθίων να αποτελούν ένα από τα κύρια πεδία διερεύνησης τα τελευταία χρόνια (Lee *et al.*, 2003; Falowo *et al.*, 2014). Επίσης, η εφαρμοζόμενη δοσολογία στη διατροφή των πτηνών πρέπει να είναι τέτοια ώστε να αποφευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις χορήγησης των φυσικών αυτών αντιοξειδωτικών καθώς τότε εμφανίζουν αντίστροφα αποτελέσματα παρουσιάζοντας προ-οξειδωτική δράση (Falowo *et al.*, 2014).

2.5.1 Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο πλάσμα αίματος

Η προσθήκη μιγμάτων αιθέριων ελαίων σε σιτηρέσια παχυνόμενων ορνιθίων (Hoffman-Pennesi and Wu., 2010; Paraskeuas *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2017a; Paraskeuas *et al.*, 2017b) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της προσδιοριζόμενης με τη μέθοδο O.R.A.C. ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος. Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος η οποία προσδιορίστηκε με μέθοδο DPPH ύστερα από προσθήκη αιθέριων ελαίων ρίγανης (Roofchae *et al.*, 2011), καθώς και μίγματος αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού και φύλλων λεμονιάς, η οποία προσδιορίστηκε με μέθοδο ELISA (Alzawqari *et al.*, 2016). Οι βελτιώσεις αυτές της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος των πτηνών πιθανόν να οφείλονται στα ενεργά συστατικά των αιθέριων ελαίων αλλά και στις φαινολικές τους ομάδες οι οποίες ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική επίδραση (Polat *et al.*, 2011).

Επιπρόσθετα, οι προαναφερθείσες επιδράσεις της προσθήκης των φυτοβιοτικών επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, πιθανόν να οφείλονται και σε αυξήσεις της ενεργότητας πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως μεταξύ άλλων η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η υπεροξειδική δεισμουτάση (SOD) και η καταλάση (CAT). Πράγματι, η προσθήκη των αιθέριων ελαίων, μιγμάτων ή αποξηραμένων τμημάτων τους έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της GPx (Faix *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Ciftci *et al.*, 2010; Hashemipour *et al.*, 2013; Akbarian *et al.*, 2014), της SOD (Zhang *et al.*, 2009; Hashemipour *et al.*, 2013) και της CAT (Ciftci *et al.*, 2010) στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων. Όπως αναφέρεται στη μελέτη των Faix *et al.* (2009) αύξηση στην ενεργότητα ενός από τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που προαναφέρθηκαν, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), συνοδεύεται τις περισσότερες φορές με ελάττωση της συγκέντρωσης της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) στο πλάσμα του αίματος των παχυνόμενων ορνιθίων ύστερα από προσθήκη φυτοβιοτικών στο σιτηρέσιό τους. Η παραπάνω αναφορά δύναται να ενισχυθεί με την ελάττωση της συγκέντρωσης MDA άρα και καθυστέρησης της οξείδωσης, με ταυτόχρονη αύξηση της ενεργότητας της GPx στο πλάσμα του αίματος των πτηνών που παρατηρείται σε μεγάλο αριθμό μελετών (Zhang *et al.*, 2009; Ciftci *et al.*, 2010; Hashemipour *et al.*, 2013; Akbarian *et al.*, 2014) ύστερα από προσθήκη φυτογενών συστατικών όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.8.

Πίνακας 2.5. Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο πλάσμα του αίματος

Φυτοβιοτικό	Δοσολογία	Μέθοδος Προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης	Επίδραση	Βιβλιογραφική Αναφορά
Αιθέριο έλαιο Κανέλας (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	0, 0.025, 0.05, 0.1 % της τροφής	Συγκέντρωση μηλονικής διαλδεύδης (MDA), Μέτρηση ενεργότητας GPx, SOD	↑ GPx (0.1 %)	Faix <i>et al.</i> , 2009

Αποξηραμένη πιπερόριζα (<i>Zingiber officinale</i>)	5 g/kg	Συγκέντρωση MDA, Μέτρηση ενεργότητας GPx, SOD	↓ MDA ↑ GPx ↑ SOD	Zhang <i>et al.</i> , 2009
Αιθέριο έλαιο κανέλας (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	500-1000ppm	Συγκέντρωση MDA, Μέτρηση ενεργότητας GPx, CAT	↓ MDA ↑ GPx ↑ CAT	Ciftci <i>et al.</i> , 2010
Αιθέρια έλαια θυμαριού, θυμόλης, καρβακρόλης, κιναμαλδεύδης και κανέλλας	0.2, 0.4, 0.8 g/kg (θυμόλη) 2, 4 ml/kg (αιθέριο έλαιο θυμαριού)	Υδρόφιλη και λιπόφιλη μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (ORAC)	↑ αντιοξειδωτική δράσης για αιθέρια έλαια θυμαριού και θυμόλης	Hoffman- Pennesi and Wu., 2010
Αιθέριο έλαιο Ρίγανης (<i>Origanum vulgare</i> L.)	300, 600 και 1200 mg/kg	Με δέσμευση ελεύθερων ριζών με μέθοδο DPPH (1,1-diphenyl-2- picryl hydrazyl)	↑ αντιοξειδωτικής δράσης	Roofchae <i>et al.</i> , 2011
Μίγμα αιθέριων ελαίων καρβακρόλης, θυμόλης	0, 60, 100 και 200 mg/kg	Συγκέντρωση MDA, Μέτρηση ενεργότητας GPx, SOD	↓ MDA ↑ GPx ↑ SOD	Hashemipour <i>et al.</i> , 2013
Μίγμα αιθέριων ελαίων κουρκουμά (<i>Curcuma xanthorrhiza</i>)	200, 400 mg/kg	Συγκέντρωση MDA, Μέτρηση ενεργότητας GPx	↓ MDA ↑ GPx	Akbarian <i>et al.</i> , 2014

και ρίγανης (<i>Origanum Compactum</i>)					
Μίγμα αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού και φύλλων λεμονιάς	0.4%, 0.8%	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα με μέθοδο ELISA και συγκέντρωση MDA	↑	Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	Alzawqari <i>et al.</i> , 2016
Μίγμα αιθέριων ελαίων ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών	125 mg/kg	Μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (ORAC)	↑	Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	Paraskeuas <i>et al.</i> , 2016b
Μίγμα αιθέριων ελαίων με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη	0, 100, 150 mg/kg	Μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (ORAC)	↑	Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	Paraskeuas <i>et al.</i> , 2017a
Μίγμα αιθέριων ελαίων με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη	0, 100, 150 mg/kg	Μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (ORAC)	↑	Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	Paraskeuas <i>et al.</i> , 2017b

2.5.2 Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο κρέας

Είναι γνωστό ότι ο τύπος και η σύσταση του σιτηρεσίου επηρεάζει την οξειδωτική κατάσταση του κρέατος στα ορνίθια κρεοπαραγωγής. Η προσθήκη φυτοβιοτικών μέσω της διατροφής έχει αναφερθεί (Botsoglou *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Paraskeuas *et al.*, 2016) ότι πιθανόν προκαλεί καθυστέρηση στη διαδικασία οξείδωσης του λίπους του κρέατος. Η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ελαττώνει τη διάρκεια ζωής του κρέατος, τη διατροφική του αξία και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά με το φαινόμενο αυτό να εντείνεται στο μαγειρεμένο κρέας (Avila-Ramos *et al.*, 2012). Όπως λοιπόν μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό, η χρησιμοποίηση των φυτοβιοτικών ως φυσικών αντιοξειδωτικών στο κρέας δύναται να αντικαταστήσει τη χρήση της Βιταμίνης Ε η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Avila-Ramos *et al.*, 2012) αλλά αυξάνει ιδιαίτερα το κόστος παραγωγής. Για αυτό το λόγο, η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτοβιοτικών, αποτελεί ένα τομέα έρευνας με εξαιρετικό ενδιαφέρον με τη διερεύνηση των μηχανισμών που την διέπουν να αποτελεί κυρίαρχο σκοπό κατά την εκπόνηση μεγάλου αριθμού επιστημονικών μελετών.

Στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η προσθήκη αιθέριων ελαίων ρίγανης έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί καθυστέρηση της οξείδωσης στο κρέας χωρίς να επηρεάζει δυσμενώς την παραγωγικότητα των ορνιθίων (Botsoglou *et al.*, 2002). Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2.6.**, ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης μεθόδου στην πλειοψηφία των μελετών παρατηρείται αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας, και πιο συγκεκριμένα στο μηρό που εμφανίζει και τη μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα συγκριτικά με το στήθος (Botsoglou *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2008; Avila Ramos *et al.*, 2012; Akbarian *et al.*, 2014; Delles *et al.*, 2014; Barakat *et al.*, 2016; Zidan *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2016) αλλά και στο στήθος (Botsoglou *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2010; Marcincakova *et al.*, 2011; Barakat *et al.*, 2016; Zidan *et al.*, 2016; Paraskeuas *et al.*, 2016), με προσθήκη φυτοβιοτικών στο σιτηρέσιο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Η αντιοξειδωτική επίδραση των φυτοβιοτικών έχει αναφερθεί ότι είναι πιθανόν να είναι εξαρτώμενη από την εφαρμοζόμενη σε κάθε περίπτωση δοσολογία (Lee *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, η αύξηση αυτή της αντιοξειδωτικής δράσης στο μηρό και στο στήθος των ορνιθίων κρεοπαραγωγής

πιθανόν να εξηγείται από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών των χρησιμοποιούμενων αιθέριων ελαίων, τα οποία έχει διαπιστωθεί πως βελτιώνουν τη διάρκεια ζωής του και την ποιότητα του κρέατος μέσω αυτής της καθυστέρησης στην οξείδωση (Botsoglou *et al.*, 2002; Brenes and Roura, 2010). Επιπρόσθετα, η εφαρμογή των φυτοβιοτικών στη διατροφή των κρεοπαραγών ορνιθίων επιδρά θετικά επί της ενίσχυσης της σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και ελαττώνει την οξείδωση των λιπιδίων του κρέατος, λόγω της ενίσχυσης της δράσης ενζύμων τα οποία περιέχουν θειολ-ομάδες όπως η αναγωγάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Paraskeuas *et al.*, 2016).

Πίνακας 2.6. Αντιοξειδωτική δράση φυτοβιοτικών στο κρέας

Φυτοβιοτικό	Δοσολογία	Μέθοδος	Μηρός	Στήθος	Βιβλιογραφική Αναφορά
Μ.Α.Ε.¹ από <i>Agrimonia eupatoria</i>, <i>Echinacea angustifolia</i>, <i>Ribes nigrum</i> και <i>Cinchona succirubra</i>.	0.5 και 1.0 g/kg τροφής	Συγκέντρωση μηλονικής διαλδεϋδης (MDA),	↓ MDA	↓ MDA	Botsoglou <i>et al.</i> , 2004
Μ.Α.Ε. φυλλών μουριάς, Ιαπωνικό αιγόκλημα	0.3 και 1.0 % της τροφής	Μέθοδος DPPH, μέθοδος TBARS, ORAC	↑ ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH, ORAC), ↓ MDA (TBARS)	Δ.Μ. ²	Jang <i>et al.</i> , 2008
Αιθέρια έλαια θυμόλης-καρβακρόλης	150 mg/kg τροφής	Μέθοδος TBARS	-	↓ MDA (TBARS)	Luna <i>et al.</i> , 2010

Μελισσόχορτο και συνδυασμός λευκάγκαθων και μυριόφυλλου		1 και 2 % της τροφής	Μέθοδος TBARS	Δ.Μ.	↓ (TBARS)	MDA	Marcincakova <i>et al.</i> , 2011
Αιθέριο έλαιο Ρίγανης		100mg/kg τροφής	Μέθοδος TBARS	↓ (TBARS)	MDA	Δ.Μ.	Avila-Ramos <i>et al.</i> , 2012
Μ.Α.Ε. και κουνκουμά ρίγανης		200, 400 mg/kg τροφής	Μέθοδος TBARS, μέτρηση ενεργότητας GPx, SOD	↓ (TBARS), ↑ GPx ↑ SOD	MDA	No effect (MDA TBARS), ↑ GPx ↑ SOD	Akbarian <i>et al.</i> , 2014
Φυσικό αντιοξειδωτικό άλγης		10 IU/kg τροφής	Μέθοδος TBARS, Μέτρηση ενεργότητας GPx, SOD, CAT	↓ (TBARS) ↑ GPx, ↑ SOD, ↑ CAT	MDA	Δ.Μ.	Delles <i>et al.</i> , 2014
Άλεσμα γλυκάνισου		0.25, 0.50, 0.75 g/kg τροφής	Μέτρηση MDA και ενεργότητας GSH	↓ MDA ↑ GSH		↓ MDA ↑ GSH	Barakat <i>et al.</i> , 2016
Άλεσμα πιπερόριζας, Αιθέριο έλαιο θυμόλης		5, 10, 15 g αλέσματος πιπερόριζας/kg τροφής, 200, 400 mg αιθέριου έλαιου	Μέτρηση MDA και ενεργότητας GSH	↓ MDA ↑ GSH		↓ MDA ↑ GSH	Zidan <i>et al.</i> , 2016

θύμολης/kg τροφής								
M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών	125 mg/kg	Μέθοδος ORAC	↑	Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	↑	Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	Paraskeuas <i>et al.</i> , 2016	<i>et</i>
M.A.E. με 0, 100, 150 mg/kg μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη		Μέθοδος ORAC	-		-		Paraskeuas <i>et al.</i> , 2017a	<i>et</i>
M.A.E. με 0, 100, 150 mg/kg μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη		Μέθοδος ORAC	-		-		Paraskeuas <i>et al.</i> , 2017b	<i>et</i>

¹ Δ.Μ.: Δεν μετρήθηκε

² Μ.Α.Ε.: Μίγμα αιθέριων ελαίων

2.6 Αντιμικροβιακή δράση φυτοβιοτικών

Η συσχέτιση της εντερικής υγείας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με την εντερική μικροχλωρίδα και τους βακτηριακούς πληθυσμούς που την απαρτίζουν, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την καλύτερη κατανόηση της δράσης διατροφικών παραγόντων όπως τα φυτοβιοτικά επί αυτής. Είναι γνωστό ότι, η σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή βελτίωσης αλλά και ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς ορισμένοι βακτηριακοί πληθυσμοί διαδραματίζουν ρόλους ζωτικής σημασίας για την παρουσία συγκεκριμένων λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο εντερικό περιβάλλον (Sugiharito *et al.*, 2016). Για παράδειγμα βακτήρια του φύλου *Bacteroidetes* (π.χ. *Bacteroides fragilis*) έχει αποδειχτεί ότι συνδέονται με την παραγωγή ιντερλευκίνης 17 (IL-17) η οποία σχετίζεται με την σειρά της με την παραγωγή T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων, ενώ βακτήρια του γένους *Lactobacillus*

έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνοντας την αντίσταση σε ασθένειες, με την απελευθέρωση χαμηλού μοριακού βάρους πεπτιδίων που ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση (Sugiharito *et al.*, 2016). Εκτός της εντερικής υγείας η μικροβιακή χλωρίδα σχετίζεται με τον ενεργειακό μεταβολισμό του ξενιστή, τη σύνθεση βιταμινών, τη ρύθμιση της λειτουργίας του εντερικού επιθηλίου, την πέψη των θρεπτικών συστατικών της τροφής ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό των λιπών, των αμινοξέων, την παραγωγή Π.Λ.Ο. και κατά συνέπεια διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο αναφορικά με την παραγωγική συμπεριφορά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Lan *et al.*, 2004; Sugiharito *et al.*, 2016). Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η εξασφάλιση της ισορροπίας στους πληθυσμούς της εντερικής μικροχλωρίδας είναι σημαντική για την εύρυθμη λειτουργία των ομοιοστατικών μηχανισμών, της πεπτικής αλλά και αμυντικής λειτουργίας του εντερικού συστήματος.

Στο εντερικό περιβάλλον περιέχονται ωφέλιμα για την υγεία βακτήρια όπως τα θετικά κατά Gram γένη των *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, αλλά και δυνητικά παθογόνα βακτήρια όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Clostridium* spp., *Salmonella* και *Escherichia coli*, ενώ ταυτόχρονα είναι κοινά αποδεκτό πως η ικανή και αναγκαία συνθήκη που πρέπει να ισχύει για την εξασφάλιση της εντερικής υγείας στα ορνίθια κρεοπαραγωγής είναι πως πρέπει να διατηρείται μια αναλογία 85-15 % μεταξύ ωφέλιμων και δυνητικά παθογόνων βακτηρίων (Sugiharito *et al.*, 2016). Πρέπει να σημειωθεί πως η παραπάνω αναλογία έχει αναφερθεί πως διαταράσσεται με την προσθήκη αντιβιοτικών στο σιτηρέσιο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Choct *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα, οι μικροβιακοί πληθυσμοί, εξελίσσονται και αυξάνονται σε ποικιλία όσο τα ορνίθια κρεοπαραγωγής αναπτύσσονται, καθώς επίσης η σύνθεση τους διαφοροποιείται στα διάφορα τμήματα του εντερικού σωλήνα (Lan *et al.*, 2004). Στον ειλεό των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, σχεδόν γύρω στο 70% των συνολικών βακτηρίων ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*, ενώ οι υπόλοιποι ανήκουν στην οικογένεια *Clostridiaceae* (11%) και στα γένη *Streptococcus* (6.5%) και *Enterococcus* (6.5%) (Lu *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2004). Στο τυφλό έντερο οι κυρίαρχοι βακτηριακοί πληθυσμοί ανήκουν στην οικογένεια *Clostridiaceae* (65%), με τα υπόλοιπα γένη βακτηριακών πληθυσμών να ανήκουν στα γένη *Fusobacterium* (14%), *Lactobacillus* (8%) και *Bacteroides* (5%). Οι πληθυσμοί των βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Pseudomonas* spp δεν εντοπίζονται πάνω από 2% ο καθένας στο περιβάλλον του τυφλού εντέρου (Lu *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2004).

Η σύνθεση των πληθυσμών των βακτηρίων του εντερικού περιβάλλοντος επηρεάζεται από διατροφικούς παράγοντες αλλά και από παράγοντες προερχόμενους από τον οργανισμό ξενιστή. Όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 2.7.**, μίγματα αιθέριων ελαίων προερχόμενα από ρίγανη, θυμάρι και γλυκάνισο, καθώς επίσης και συστατικά αιθέριων ελαίων όπως θυμόλη, καρβακρόλη, καψαϊκίνη και κινναμαλδεύδη έχει αναφερθεί ότι ασκούν αντιβακτηριακή δράση έναντι πληθυσμών δυνητικά παθογόνων βακτηρίων όπως *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* spp. και *Clostridium perfringens* (Jamroz *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2014; Franciosini *et al.*, 2015; Hashemipour *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2016; Mohiti-Asli *et al.*, 2017), όμως δύναται να ρυθμίζουν και ωφέλιμους βακτηριακούς πληθυσμούς για την εντερική υγεία των ορνιθίων, προκαλώντας την πληθυσμιακή τους αύξηση όπως αυτούς των *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Mountzouris *et al.*, 2011; Franciosini *et al.*, 2015; Hashemipour *et al.*, 2016). Ο μηχανισμός δράσης φυτογενών συστατικών όπως η θυμόλη και η καρβακρόλη πιθανόν να συνδέεται με την επίδραση τους επί της ακεραιότητας της βακτηριακής μεμβράνης με άμεσα δυσμενή αποτελέσματα επί του ομοιοστατικού μηχανισμού της διατήρησης του pH στο κυτταρικό περιβάλλον (Hashemipour *et al.*, 2016). Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί επίδρασης των φυτοβιοτικών επί της εντερικής μικροχλωρίδας είναι ένα θέμα το οποίο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση ακόμα και σε συνδυασμό με παράγοντες όπως τα συστατικά του σιτηρεσίου, ο τύπος του βασικού σιτηρεσίου, η απαραίτητη χορηγούμενη δόση, η θερμική καταπόνηση των ορνιθίων και ο συνδυασμός των επιδράσεων τους με κάποια επιμόλυνση με παθογόνο παράγοντα (Mountzouris *et al.*, 2011).

Εκτός φυσικά των φυτοβιοτικών, υπάρχει ένα πλήθος ακόμα παραγόντων που δύναται να επηρεάσουν τη πληθυσμιακή σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας. Για παράδειγμα το είδος του δημητριακού καρπού στο βασικό σιτηρέσιο ή η προσθήκη ενζύμων και προβιοτικών στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τους αριθμούς των πληθυσμών των βακτηρίων. Οι Hashemipour *et al.* (2016) στη μελέτη τους αναφέρουν ότι σε ορνίθια κρεοπαραγωγής στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο σε σιτάρι, η προσθήκη ξυλανάσης είχε ως αποτέλεσμα την συνολική ελάττωση βακτηριακών πληθυσμών και κυρίως των δυνητικά παθογόνων (*C. perfringens* και *E. coli*) με ταυτόχρονη αύξηση των ωφέλιμων *Lactobacilli*. Στη ίδια μελέτη, οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν στο γεγονός

ότι, κατά τον πολυμερισμό των πολυσακχαριτών της τροφής η προσθήκη εξωγενών ενζύμων δύναται να οδηγήσει στην παραγωγή γαλακτό-, γλυκό-, μαννό- και ξυλό-ολιγομερών τα οποία είναι όμοια με αυτά που παράγονται κατά την προσθήκη πρεβιοτικών αλλά και φυτοβιοτικών με άμεσο αποτέλεσμα την ενίσχυση της παραγωγής ωφέλιμων για την εντερική υγεία βακτηριακών πληθυσμών όπως τα *Bifidobacteria* και τα *Lactobacilli*.

Πίνακας 2.7. Αντιμικροβιακή δράση φυτοβιοτικών

Φυτοβιοτικό	Δοσολογία	Περιεχόμενο	Επίδραση επί μικροβιακών πληθυσμών	Βιβλιογραφική αναφορά
M.A.E.* καπσαϊκίνης, καρβακρόλης και κινναμαλδεύδης	150, 300 mg / kg τροφής	Τυφλού εντέρου	↓ <i>C. perfringens</i> ↓ <i>E. Coli</i>	Jamroz <i>et al.</i> , 2003
M.A.E. με κύριο ενεργό συστατικό την θυμόλη	25, 50 mg / kg τροφής	Είλεού και Τυφλού εντέρου	↓ <i>E. coli</i>	Jang <i>et al.</i> , 2007
M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών	80, 125, 250 mg / kg τροφής		↑ <i>Lactobacilli</i> , ↑ <i>Bifidobacterium</i> , ↑ Gram+ cocci	Mountzouris <i>et al.</i> , 2011
M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών	125 mg / kg τροφής	Είλεού	Καμία επίδραση σε Ολικά βακτήρια, <i>Lactobacilli</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Coliforms</i> , <i>Salmonellae</i>	Hong <i>et al.</i> , 2012
M.A.E.	250 mg / kg	Λεπτού και	↓ <i>C. perfringens</i>	Cho <i>et al.</i> , 2014

θυμαριού και γλυκάνισου	τροφής	τυφλού εντέρου	↓ E. coli	
Αιθέρια έλαια ρίγανης και δενδρολίβανου	1, 2 g / kg τροφής	Είλεού και Τυφλού εντέρου	↑ <i>Lactobacilli</i> , ↓ <i>Staphylococcus</i> spp.	Franciosini <i>et al.</i> , 2015
M.A.E. θυμόλης και καρβακρόλης	0, 100 και 200 mg / kg τροφής	Τυφλού εντέρου	↓ <i>C. perfringens</i> ↓ <i>E. Coli</i> , ↑ <i>Lactobacilli</i>	Hashemipour <i>et al.</i> , 2016
Αιθέριο έλαιο ρίγανης	500 mg / kg τροφής	Είλεού και τυφλού εντέρου	↓ <i>Salmonellae</i> , Καμία επίδραση σε ολικά βακτήρια, <i>E. Coli</i> , <i>Lactobacilli</i>	Pathak <i>et al.</i> , 2016
Αιθέριο έλαιο ρίγανης, M.A.E. ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών	0, 150, 300, 500 mg / kg τροφής	Είλεού	No effects on <i>Lactobacilli</i> ↓ <i>E. Coli</i>	Mohiti-Asli <i>et al.</i> , 2017

* Μίγμα αιθέριων ελαίων

2.7 Επίδραση φυτοβιοτικών επί της φλεγμονώδους απόκρισης

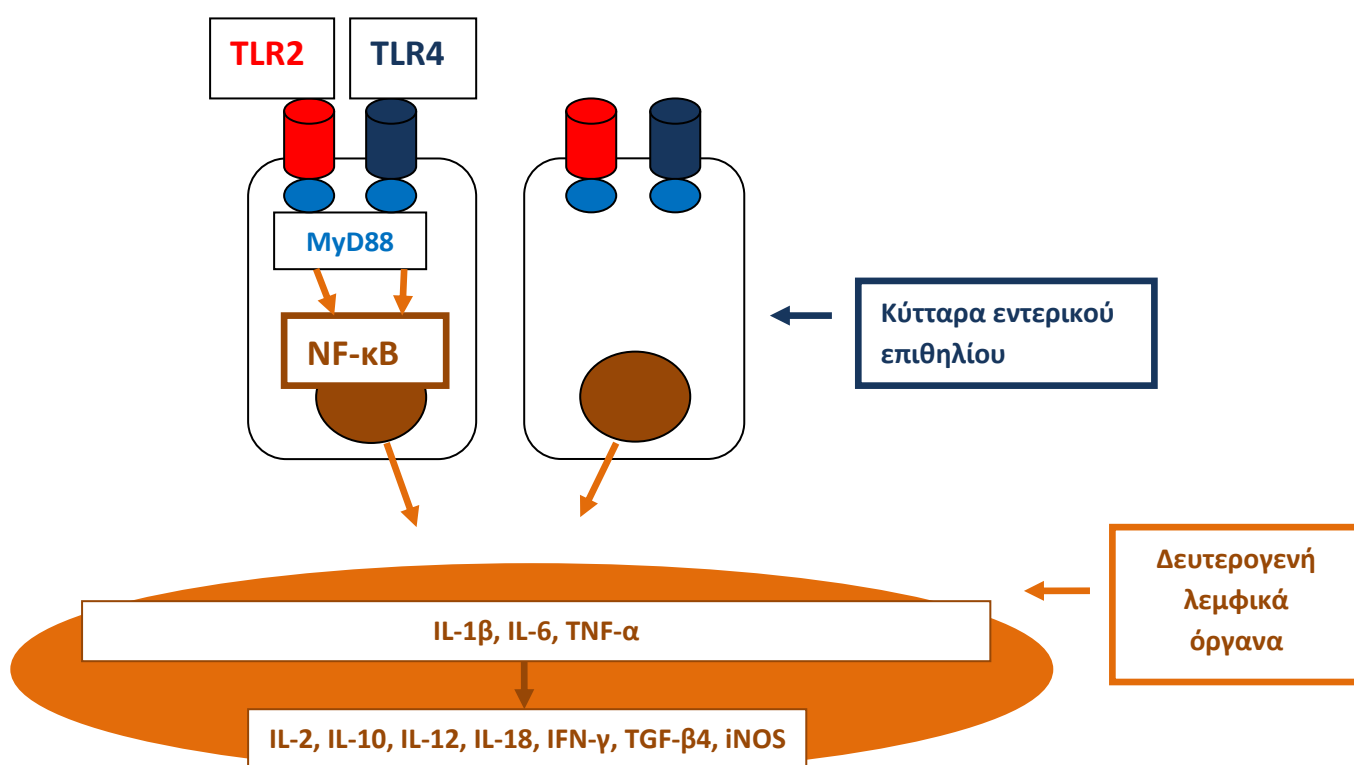
Κυρίαρχο ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση (προ-, αντιφλεγμονώδη απόκριση) στο εντερικό περιβάλλον, διαδραματίζουν οι υποδοχείς Toll-like (TLRs) οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου I και αποτελούν τους πιο διακεκριμένους μεταξύ των PRRs (pattern recognition receptors) υποδοχείς, εντοπίζοντας πιθανούς παθογόνους μικροβιακούς παράγοντες και ενεργοποιώντας στη συνέχεια ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών αλλά και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών (Keestra *et al.*, 2013; Μαυρούλη., 2014). Διαθέτουν μια εξωκυτταρική περιοχή που φέρει

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των εκάστοτε βακτηριακών δομών, ενώ φέρουν ένα βραχύ διαμεμβρανικό τμήμα και μια κυτταροπλασματική περιοχή, γνωστή ως «Toll/IL-1 receptor» (TIR), που φέρει πολλές ομολογίες με την ενδοκυτταρική περιοχή του υποδοχέα των ιντερλευκινών 1 και 18 (IL-1 και -18) (Keestra *et al.*, 2013; Μαυρούλη., 2014). Η αλληλεπίδραση του μικροβιακού παράγοντα, με τον αντίστοιχο TLR προκαλεί ολιγομερισμό του υποδοχέα και συμβάλει στην ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής μηνυμάτων.

Οι υποδοχείς Toll-like μπορούν να ταξινομηθούν σε υποοικογένειες ανάλογα με τα είδη των μικροβιακών παραγόντων που εντοπίζουν. Για παράδειγμα, οι υποδοχείς TLR2 εντοπίζουν τα λιποτειχοϊκά οξέα, τις λιποπρωτεΐνες και την πεπτιδογλυκάνη των Gram θετικών βακτηρίων και οι υποδοχείς TLR4 τα Gram-αρνητικά βακτήρια TLR4 μέσω των λιποπολυσακχαριτών τους (Du *et al.*, 2016). Όλοι οι TLRs, εκτός του TLR3, χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη προσαρμογέα MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), που πλησιάζει τον υποδοχέα μέσω της TIR περιοχής του καρβοξυλικού της άκρου, η οποία αλληλεπιδρά με την TIR περιοχή του TLR. Μετά τη διέγερσή τους, οι υποδοχείς toll-like ενεργοποιούν ενδοκυττάρειες οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, συνδιεγερτικών και προσκολλητικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα, με την επιστράτευση κινάσων σερίνης-θρεονίνης, προκαλείται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις (TNF-γ, IL-1β, IL-6, IL-8 και IL-12 και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (πχ. IL-10 και TGF-β4) (Kawai and Akira., 2007; Keestra *et al.*, 2013). Έτσι ενεργοποιείται μια οδός μεταγωγής μηνυμάτων, γνωστή ως ανεξάρτητο μονοπάτι MyD88, που είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση του NF-κΒ (**Σχήμα 3**).

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες ανάλογα με την κατεύθυνση τους, δηλαδή αν είναι προφλεγμονώδεις (πχ. οι ιντερλευκίνες IL-1, IL-6, IL-8) ή αντιφλεγμονώδεις (πχ. νεκρωτικός παράγοντας όγκου α TFN-α). Πιο συγκεκριμένα, οι κυτταροκίνες IL-1 και TNF-α, ρυθμίζουν επιπρόσθετες οδούς παραγωγής πρωτεϊνών οι όποιες καταλήγουν στην παραγωγή της επαγόμενης συνθετάσης του NO (iNOS) και άλλων προφλεγμονωδών (πχ. οι ιντερλευκίνες IL-2, IL-12, IL-18) και αντιφλεγμονωδών (π.χ. η ιντερλευκίνη IL-10, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TGF-β4),

κυτταροκινών που βρίσκονται τριγύρω από το προσβαλλόμενο δευτερογενές λεμφικό όργανο (λεμφαδένες, σπλήνας, λεμφικός ιστός γαστρεντερικού σωλήνα) (Sa *et al.*, 2014).



Σχήμα 3. Απεικόνιση οδού προ-αντιφλεγμονώδους απόκρισης στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (Kawai and Akira, 2007; Keestra *et al.*, 2013)

Ακολουθώντας την οδό ενεργοποίησης της φλεγμονώδους απόκρισης, η οποία όπως είδαμε αρχίζει από τους υποδοχείς Toll-like στο εντερικό επιθήλιο και καταλήγει στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, θα προσπαθήσουμε να δώσουμε μια εικόνα της επίδρασης των φυτοβιοτικών επί αυτής όπως παρουσιάζεται στη διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας 2.8). Όπως παρουσιάζεται στην *in vitro* μελέτη των Youn *et al.* (2008), διαπιστώθηκε ταυτόχρονη ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα TLR4 και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με προσθήκη αιθέριου ελαίου

κιναμαλδεύδης. Επιπρόσθετα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vivo* διαπιστώθηκε ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα TLR4 και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής ύστερα από προσθήκη στο σιτηρέσιο M.A.E. καρβακρόλης, κυμένιου, θυμόλης και χ-τερπινένιου (Lu *et al.*, 2014). Επίσης, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε προσθήκη M.A.E. θυμόλης και καρβακρόλης, διαπιστώθηκε μείωση της γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα TLR2 στο επιθήλιο του ειλεού (Du *et al.*, 2016). Αυτή η πτωτική τάση της γονιδιακής έκφρασης των υποδοχέων toll –like, είναι πολύ σημαντική για τον περιορισμό της φλεγμονώδης απόκρισης και όπως αναφέρεται από τους Kawai and Akira. (2007), υπάρχουν ενδείξεις ότι τα φυτοβιοτικά–όπως είδαμε και στις παραπάνω μελέτες- δύναται να την προκαλούν, ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση (Brenes and Roura, 2010). Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των φυτοβιοτικών είναι αυτός ο οποίος αναφέρεται στην μελέτη των Lillehoj and Lee, (2012), οι οποίοι υποστηρίζουν ότι οι ουσίες αυτές εμποδίζουν απευθείας την ενεργοποίηση των υποδοχέων Toll-like στην επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου και κατά συνέπεια και όλων των παραγόμενων από την οδό του MyD88 πρωτεϊνών όπως του NF-κΒ και των κυτταροκινών της φλεγμονώδους απόκρισης. Στο ίδιο μήκος κύματος, οι Huang and Lee, (2018), στη μελέτη τους αναφέρουν ότι πιθανολογείται ότι η καρβακρόλη καταστέλλει τη λειτουργία μεταγωγής σημάτων από τους υποδοχείς Toll-like στην επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου και από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ αλλά τονίζεται επίσης ότι παραπάνω έρευνα απαιτείται για την ακριβέστερη διευκρίνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή την υπόθεση. Με βάση τα παραπάνω δίνεται η γενική εικόνα πως υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα φυτοβιοτικά ρυθμίζουν την φλεγμονώδη αντίδραση μέσω της επίδρασης τους επί των υποδοχέων Toll-like όμως, πρέπει να σημειωθεί ότι παραπάνω διερεύνηση απαιτείται για την αναγνώριση και εξακρίβωση των μηχανισμών δράσης επί των υποδοχέων αυτών αλλά και των επιδράσεων αυτών των μεταβολών στην έκφραση των υπολοίπων γονιδίων που εμπλέκονται στις σχετιζόμενες με αυτούς οδούς μεταγωγής μοριακών μηνυμάτων.

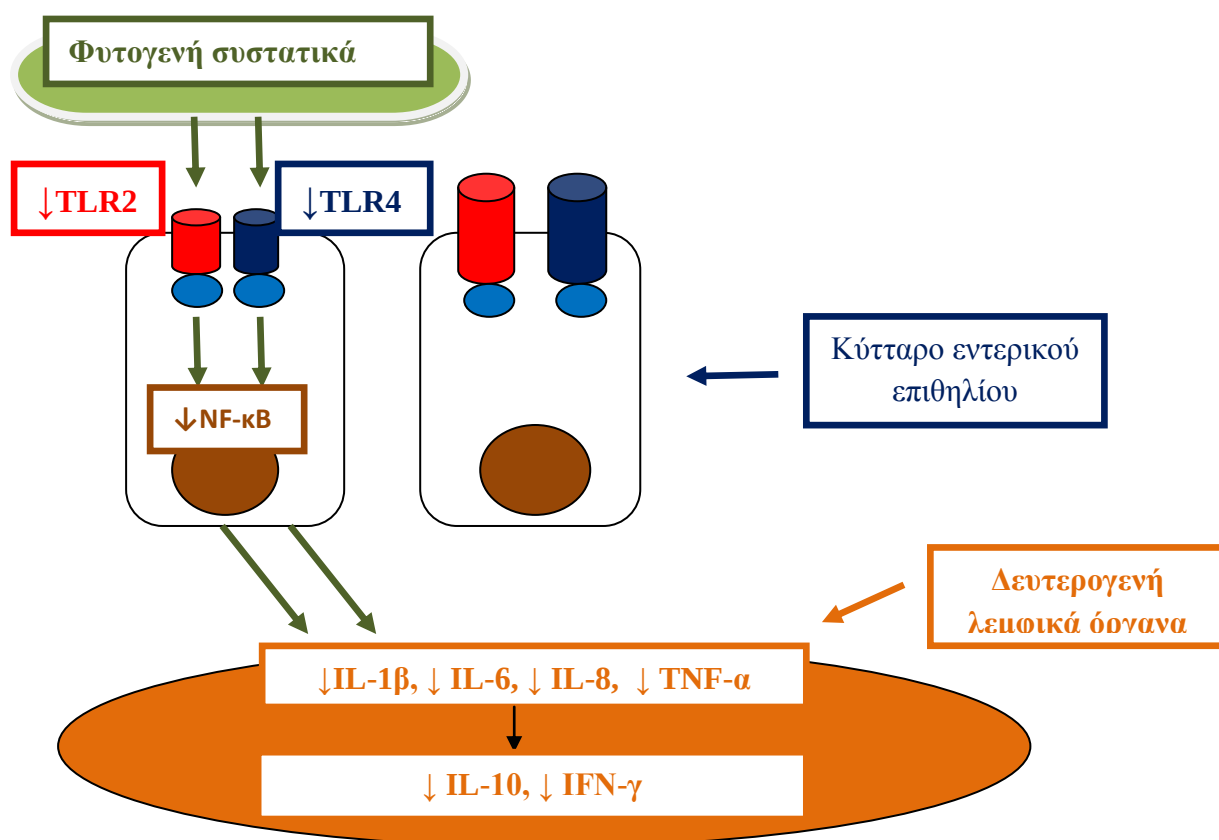
Πίνακας 2.8 Επίδραση φυτοβιοτικών σε βιοδείκτες που σχετίζονται με την προ- και αντιφλεγμονώδη ανοσοβιολογική απόκριση.

Φυτοβιοτικό	Δοσολογία	Ιστός	Βιοδείκτης	Βιβλιογραφική Αναφορά
Αιθέριο έλαιο κινναμαλδεύδης	<i>Πείραμα in vitro</i>	Κύταρρα RAW 264.7 cells (a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71) 293 T (human embryonic kidney cells)	↓ TLR4 ↓ NF-κβ	Youn <i>et al.</i> , 2008
Αιθέριο έλαιο ανηθόλης	15 mg/kg τροφής	Εντερικά λεμφοκύτταρα	Σε μη επιμολυσμένα ορνίθια ↓ IL-6 ↓ IL-8 ↓ TNFSF15 -IL-10 Σε επιμολυσμένα ορνίθια ↑ IL-6 ↑ IL-8 ↑ TNFSF15 ↑ IL-10	Kim <i>et al.</i> , 2013
Μ.Α.Ε. καρβακρόλης, κυμένιο, θυμόλη, γ-	300 mg/kg τροφής	λεμφάδενες τυφλού εντέρου	↓ TLR4 ↓ IL-10 ↓ TNF-α ↓ IFN-γ	Lu <i>et al.</i> , 2014

τερπινένιο				
Άλεσμα γλυκάνισου	0.25, 0.50, 0.75 g/kg τροφής	Πλάσμα αίματος	↑ IgA ↑ IL-2 ↑ IFN-γ ↑ IL-10	Barakat <i>et al.</i> , 2016
M.A.E. θυμόλης και καρβακρόλης	0,60, 120, 240 mg/kg τροφής	ειλεός	↓ TLR2	Du <i>et al.</i> , 2016
Άλεσμα πιπερόριζας, Αιθέριο έλαιο θυμόλης	5, 10, 15 g αλέσματος πιπερόριζας/kg τροφής, 200, 400 mg αιθέριου έλαιου θύμολης/kg τροφής	Πλάσμα αίματος	↑ IFN-γ ↑ IL-2	Zidan <i>et al.</i> , 2016
Αιθέριο έλαιο ρίγανης	25 mg/kg τροφής	νήστιδα	↓ NF-kB ↓ IL-1β ↓ IFN-γ	Zou <i>et al.</i> , 2016

Στο επίπεδο των κυτταροκινών η επίδραση των φυτοβιοτικών ακολουθεί τον γενικό κανόνα ότι αυτά παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία αποτελεσμάτων τα οποία είναι ικανά να τους προσδώσουν την ιδιότητα τους να αποτελούν ρυθμιστές της ανοσοβιολογικής απόκρισης (Brenes and Roura, 2010; Barakat *et al.*, 2016; Zidan *et al.*, 2016). Σε μη επιμολυσμένα ορνίθια με *Eimeria acervulina* η προσθήκη αιθέριου έλαιου ανηθόλη είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης των προφλεγμονώδων ιντερλευκινών IL-6, IL-8 και του αντιφλεγμονώδους νεκρωτικού παράγοντα όγκου TNFSF15 σε εντερικά λεμφοκύτταρα, ενώ ύστερα από επιμόλυνση με *Eimeria acervulina*, η προσθήκη του προαναφερθέντος φυτογενούς προϊόντος είχε ως συνέπεια την αύξηση της έκφρασης όλων των παραπάνω παραγόντων και επιπρόσθετα της αντιφλεγμονώδους ιντερλευκίνης IL-10 (Kim *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης της προφλεγμονώδους

ιντερφερόνης IFN- γ και της IL-10 στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου παρατηρήθηκε ύστερα από προσθήκη σε σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής, M.A.E. καρβακρόλης, κυμένιου, θυμόλης και χ-τερπινένιου (Lu *et al.*, 2014). Παρόμοια ελάττωση της έκφρασης της ιντερλευκίνης IL-1 β και της ιντερφερόνης IFN- γ και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, πραγματοποιήθηκε στο εντερικό επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής ύστερα από προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (Zou *et al.*, 2016). Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το **Σχήμα 4.**, στο οποίο απεικονίζεται η πιθανή επίδραση των φυτοβιοτικών επί της οδού μεταγωγής μηνυμάτων με έναρξη τους υποδοχείς toll-like όπως προέκυψε από την ανάλυση των προαναφερθέντων μελετών χωρίς μόλυνση.



Σχήμα 4. Πιθανή επίδραση φυτοβιοτικών επί της ρύθμισης της έκφρασης βιοδεικτών που εμπλέκονται στην οδό μεταγωγής μηνυμάτων των υποδοχέων toll-like σε ορνίθια κρεοπαραγωγής

Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί πως αύξηση της έκφρασης των προφλεγμονώδων IL-2 και IFN- γ στο πλάσμα του αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής, πραγματοποιήθηκε ύστερα από προσθήκη αλέσματος γλυκανίσου (Barakat *et al.*,

2016) αλέσματος πιπερόριζας και αιθέριου ελαίου ρίγανης (Zidan *et al.*, 2016). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν μεν τη ρυθμιστική δράση των φυτοβιοτικών επί της ρύθμισης της έκφρασης βιοδεικτών σχετιζόμενων με τη φλεγμονώδη απόκριση όμως έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα τα σχετιζόμενα με την επίδραση αυτών επί των βιοδεικτών που σχετίζονται με την οδό μεταγωγής μηνυμάτων των υποδοχέων toll-like. Συμπέρασμα όλων των παραπάνω αποτελεί ότι, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών και των οδών μεταγωγής μηνυμάτων που σχετίζονται με την επίδραση των φυτοβιοτικών σε βιοδείκτες σχετικούς με τη φλεγμονώδη αντίδραση και τη γενικότερη ανοσοβιολογική απόκριση, καθώς επίσης και παραγόντων που δρουν σε συνδυασμό με αυτά όπως η δοσολογία χορήγησης τους, η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου, η επίδραση παθογόνων παραγόντων και οι συνθήκες εκτροφής (θερμοκρασία, υγρασία, συνθήκες υγιεινής). Πρέπει να τονισθεί βέβαια ότι, το διακύβευμα της παραπάνω διερεύνησης είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για την ζωική παραγωγή, καθώς περαιτέρω και μεγαλύτερης ακρίβειας συμπεράσματα πάνω στην επίδραση των φυτοβιοτικών επί συγκεκριμένων οδών μεταγωγής μηνυμάτων δύναται να παρέχει νέες προοπτικές για την ενίσχυση της εντερικής φυσικής ανοσίας αλλά και να ελαχιστοποιήσει τις αρνητικές συνέπειες ασθενειών που σχετίζονται με μολύνσεις παθογόνων μικροοργανισμών στην ορνιθοτροφία.

2.8 Επίδραση φυτοβιοτικών επί βιοδεικτών της εντερικής ακεραιότητας

Το επιθήλιο του εντερικού βλεννογόνου, αποτελεί μια μεγάλη επιφάνεια με κύριες λειτουργίες την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών αλλά και την παροχή ενός αποτελεσματικού φραγμού έναντι των αντιγόνων που εισέρχονται στο εντεροκύτταρο όπως βακτήρια, τοξίνες αλλά και σχετιζόμενα με την τροφή αντιγόνα. Καταστροφή αυτού του εντερικού φραγμού έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του από τα προαφερθέντα αντιγόνα με αποτέλεσμα την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (Song *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, εκτός από τη λειτουργία του ως εντερικός φραγμός το επιθήλιο επάγει όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, την εκδήλωση μηχανισμών εσωτερικής άμυνας και επίκτητης ανοσίας. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα του επιθηλίου, μέσω της αναγνώρισης των

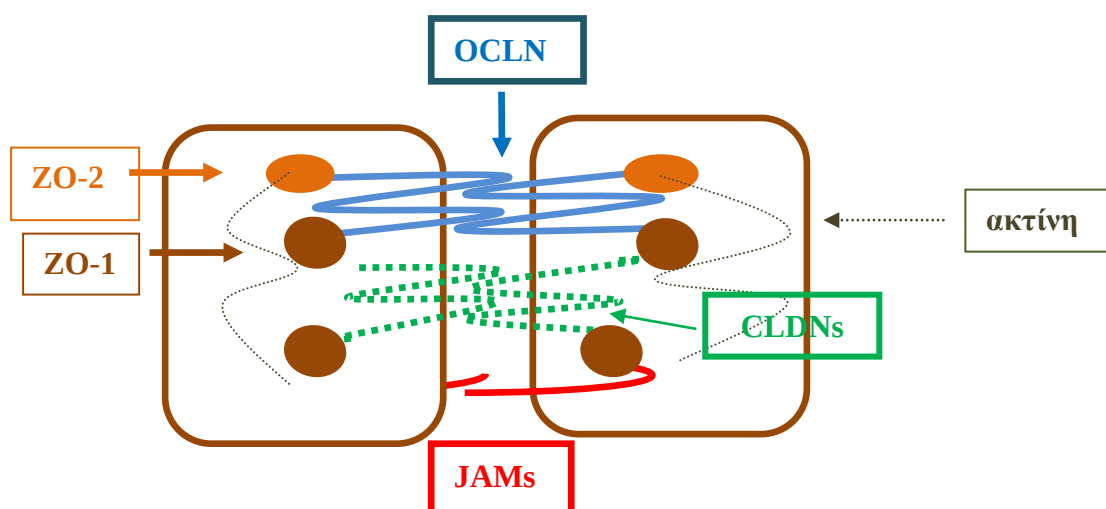
μικροοργανισμών από τους υποδοχείς toll-like αλλά και της παραγωγής κυτταροκινών, λειτουργούν ως βασικός διαμεσολαβητής μεταξύ των σημάτων του εντερικού αυλού και του λεμφικού ιστού του εντερικού επιθηλίου (Magalhaes *et al.*, 2007).

Το εντερικό τοίχωμα αποτελείται από τέσσερα στρώματα, τον βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, τον μυϊκό ιστό και τον ορό. Η επιφάνεια εντεροκυττάρων, περιέχει ένζυμα υπεύθυνα για την υδρόλυση των ολιγοσακχαριτών και των πεπτιδίων σε μονοσακχαρίτες και αμινοξέα αντίστοιχα. Τα προϊόντα της δράσης των παγκρεατικών ενζύμων αλλά και των ενζύμων της εντερικής επιφάνειας, καθώς επίσης βιταμίνες, ανόργανα στοιχεία και ηλεκτρολύτες απορροφώνται στο εσωτερικό του εντεροκυττάρου από μηχανισμούς που εμπλέκουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες μεταφοράς. Ο παρακυψελιδικός χώρος είναι σφραγισμένος με σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (tight junctions, TJs) οι οποίες ρυθμίζουν τη ροή ιόντων νερού και μικρών μορίων (Cummings *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα υδατοδιαλυτά συστατικά διέρχονται της κυτταρικής μεμβράνης με παθητική μεταφορά μέσω πόρων (διακυτταρική μεταφορά) ή εισέρχονται παράπλευρα μέσω των συμπλόκων των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (tight junctions) ανάμεσα στα εντεροκύτταρα (παρακυτταρική μεταφορά) (Cummings *et al.*, 2004).

Τα σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, αποτελούνται από τρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες τις οκλουδίνες (OCLNs), τις κλαουδίνες (CLDNs) και τα συνδεσμικά μόρια προσκόλλησης (JAMs), οι οποίες είναι συνδεδεμένες σε διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των zonula οκλουδινών (ZO) ZO-1, ZO-2, ZO-3 οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν γειτονικά κύτταρα μέσω του κυτταροσκελετού (**Σχήμα 5**). Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν συσχετισθεί με διαδικασίες σηματοδότησης και 'αγκύρωσης' του δεσμοσώματος στα μικροϊνίδια ακτίνης του κυτταρικού σκελετού σε αντίθεση με τις κλαουδίνες (CLDNs) οι οποίες αποτελούνται από σφραγιστικά μόρια και πόρους που διευκολύνουν τη μεταφορά νερού και ηλεκτρολυτών (Suzuki and Hara., 2011; Song *et al.*, 2014).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, δυσλειτουργία στα σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου που μπορεί να προκαλέσει κάποιος από τους αρχικά προαναφερθέντες παράγοντες (πχ. παθογόνο βακτήριο, τοξίνες, συστατικά τροφής), έχει ως αποτέλεσμα την

πρόκληση <ανοίγματος> του χώρου μεταξύ των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων με άμεση συνέπεια να αυξάνεται η παρακυτταρική μεταφορά στον εντερικό βλενογόνο. Για καλύτερη αξιολόγηση της ομαλής λειτουργίας αλλά και των μηχανισμών του εντερικού επιθηλιακού φραγμού είναι απαραίτητος κυρίως ο προσδιορισμός της έκφρασης των επιπέδων οκλουδίνης (OCLN) και zonula οκλουδίνης 1 (ZO-1) στο εντερικό επιθήλιο (Song *et al.*, 2014). Επίσης, σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι πέραν του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου στο εντερικό επιθήλιο, ο πρώτος φραγμός στην είσοδο των μικροοργανισμών, των τοξινών αλλά και συστατικών που βρίσκονται στην τροφή, είναι η στιβάδα της βλέννης η οποία αποτελείται κυρίως από βλενοπρωτεΐνες (MUC) οι οποίες είναι και το κύριο συστατικό της στιβάδας αυτής (Du *et al.*, 2016).



Σχήμα 5. Σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (Tight Junctions) στο εντερικό επιθήλιο

Τα φυτοβιοτικά έχει αναφερθεί ότι, βελτιώνουν την εντερική ακεραιότητα ενισχύοντας άμεσα τις πρωτεΐνες του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (Suzuki and Hara, 2011; Zou *et al.*, 2016) γεγονός το οποίο πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική προστασία του εντερικού επιθηλίου από παθογόνα βακτήρια, τοξικά συστατικά των τροφών και ενδογενώς παραγόμενων τοξικών μεταβολιτών (Placha *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ορνίθια κρεοπαραγωγής όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.9**, διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης της οκλουδίνης στο εντερικό επιθήλιο του

δωδεκαδάκτυλου (Platcha *et al.*, 2014) και του ειλεού (Du *et al.*, 2016) ύστερα από προσθήκη αιθέριων ελαίων θυμόλης και μίγματος αιθέριων ελαίων θυμόλης και καρβακρόλης αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε χοίρους διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης των κυριότερων πρωτεϊνών του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου δηλαδή της οκλουδίνης και της zonula οκλουδίνης 1 (ZO-1) σε εντερικό επιθήλιο νήστιδας, ύστερα από προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (Zou *et al.*, 2016). Επίσης σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια διαπιστώθηκε αύξηση της κλαουδίνης 3 (CLDN3) σε επιθήλιο παχέος εντέρου (Mueller *et al.*, 2013) και της οκλουδίνης σε επιθήλιο νήστιδας (Wei *et al.*, 2015) ύστερα από προσθήκη αιθέριων ελαίων μπρόκολου, θυμαρίου, δενδρολίβανου, κουρκουμά και αιθέριου ελαίου θυμόλης αντίστοιχα. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των φυτοβιοτικών επί της ενίσχυσης του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου αποτελεί η παρεμπόδιση της έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC-δ) η οποία ρυθμίζει οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που εμπλέκουν το σύμπλοκο πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (Ulluwishewa *et al.*, 2011). Για παράδειγμα, η κερκετίνη, ένα φλαβονοειδές που αποτελεί δευτερογενή φυτικό μεταβολίτη έχει διαπιστωθεί ότι επιδρά θετικά επί της εντερικής ακεραιότητας και του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου ενισχύοντας τη σύνδεση της zonula οκλουδίνης 2 (ZO-2), της οκλουδίνης (OCLN) και του (CLDN1) (Suzuki and Hara., 2011).

Πίνακας 2.9 Επίδραση φυτοβιοτικών επί της εντερικής ακεραιότητας

Βιβλιογραφική αναφορά	Φυτοβιοτικό	Δοσολογία	Είδος	Ιστός	Βιοδείκτης
Mueller <i>et al.</i>, 2013	Αιθέρια έλαια, μπρόκολου, θυμαριού, δενδρολίβανου, κουρκουμά	8750, 618, 680 και 1494 mg/kg τροφής	Ποντίκια	Επιθήλιο παχέος εντέρου	↑ CLDN3
Platcha <i>et al.</i>, 2014	Αιθέριο έλαιο θυμόλης	500 mg/kg τροφής	Ορνίθια κρεοπαραγωγής	Επιθήλιο δωδεκαδάκτυλου	↑ εντερικής ακεραιότητας

Wei et al., 2015	Αιθέριο έλαιο ρίγανης	5 και 20 mg/kg ζώντος βάρους	ποντίκια	Επιθήλιο νήστιδας	↑ OCLN
Du et al., 2016	M.A.E. θυμόλης και καρβακρόλη ς	0, 60, 120, 240 mg/kg τροφής	Ορνίθια κρεοπαρα γωγής	Επιθήλιο ειλεού	↑ OCLN
Zou et al., 2016	Αιθέριο έλαιο ρίγανης	25 mg/kg τροφής	χοίροι	Επιθήλιο νήστιδας	↑ OCLN ↑ ZO-1

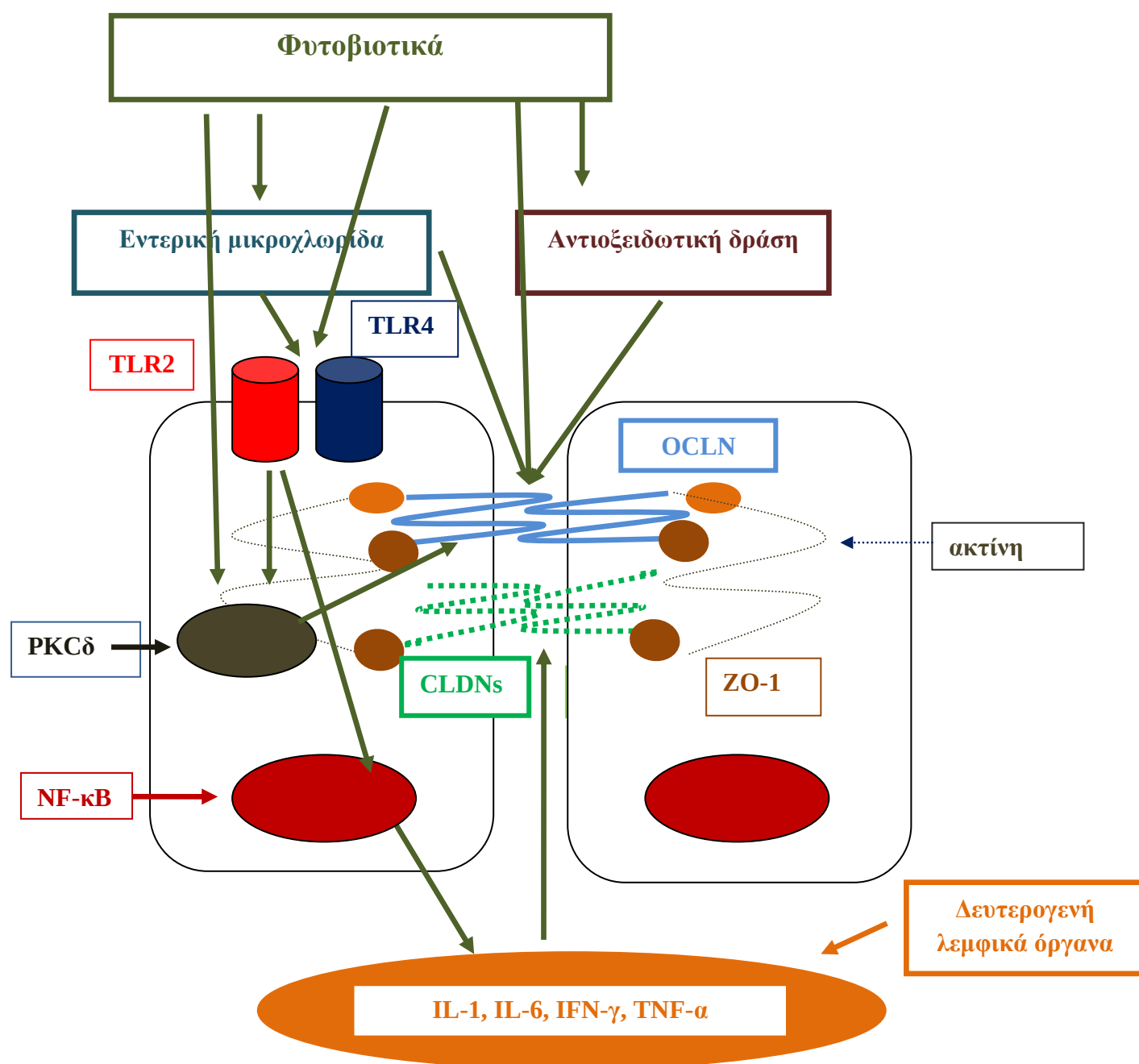
Η δράση των φυτοβιοτικών όμως, επί της ενίσχυσης του εντερικού φραγμού δύναται εκτός από άμεση να είναι και έμμεση. Όπως παρουσιάστηκε στις προηγούμενες ενότητες σε αρκετά μεγάλο αριθμό μελετών στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, τα φυτοβιοτικά δύναται να επηρεάζουν παράγοντες όπως η αντιοξειδωτική δράση στο κρέας, στο αίμα και στο εντερικό επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου (Faix *et al.*, 2009; Platcha *et al.*, 2014), η σύνθεση της εντερικής μικροβιακής μικροχλωρίδας, καθώς και βιοδείκτες που σχετίζονται με την ανοσοβιολογική απόκριση και ως άμεση συνέπεια όλων αυτών να βελτιώνουν τις παραγωγικές επιδόσεις των ορνιθίων. Στη μελέτη των Ivanov *et al.* (2011), αναφέρεται ότι η εντερική μικροχλωρίδα και ανοσοβιολογική κατάσταση αποτελούν σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι δύναται να επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργία του εντερικού φραγμού. Επιπρόσθετα, μεταβολές στην εντερική μικροχλωρίδα έχουν ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση της ανοσοβιολογικής απόκρισης, επιμέρους καταστροφή και δυσλειτουργία του εντερικού επιθηλίου καθώς επίσης έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύουν την παρακυτταρική και διακυτταρική διαπερατότητα του (Littman and Palmer 2011). Επίσης, στη μελέτη των Wei *et al.* (2015) που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια, διαπιστώθηκε ότι η δράση της προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης είχε ως αποτέλεσμα αλλαγή της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας, μείωση της έκφρασης προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών, αύξηση της έκφρασης της οκλουδίνης στο εντερικό επιθήλιο της νήστιδας διαμέσου της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Συσχέτιση της ενίσχυσης της εντερικής ακεραιότητας και της αύξησης της

αντιοξειδωτικής ικανότητας και παραγόντων που σχετίζονται με την ανοσοβιολογική απόκριση (αύξηση αντισωμάτων IgA) στο δωδεκαδάκτυλο, διαπιστώθηκε σε ορνίθια κρεοπαραγωγής και στη μελέτη των Platcha *et al.*, 2014 ύστερα από προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης. Ως συνέπεια των παραπάνω, διαπιστώνεται ότι τα φυτοβιοτικά πιθανόν να ενισχύουν την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού, εκτός από άμεσα δρώντας όπως προαναφέρθηκε επί του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου και έμμεσα μέσω των ρυθμιστικών και ευεργετικών τους επιδράσεων επί των προαναφερθέντων φυσιολογικών παραμέτρων.

Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι, τα φυτοβιοτικά δύναται να επηρεάζουν θετικά την λειτουργία του εντερικού φραγμού μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου χωρίς όμως αύξηση της έκφρασης των επιμέρους πρωτεϊνών (OCLN, CLDNs, ZO-1, ZO-2, ZO-3) (Suzuki and Hara, 2011). Αυτό πιθανόν μπορεί να συμβαίνει μέσω της επίδρασης των φυτοβιοτικών επί της οδού μεταγωγής μηνυμάτων των υποδοχέων toll-like (Kawai and Akira, 2007; Ulluwishewa *et al.*, 2011) όπως και άλλων οδών μεταγωγής μηνυμάτων που εμπλέκουν την παραγωγή προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών (Du *et al.*, 2016). Στη μελέτη των Zou *et al.* (2016) αναφέρεται ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης με κύριο συστατικό την καρβακρόλη (81.92%) στη διατροφή χοίρων είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αλλά και των προφλεγμονώδων κυτταροκινών IL-1β, IL-6, ιντερφερόνης-γ (IFN-γ), νεκρωτικού παράγοντα όγκου α (TNF-α) με ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης της οκλουδίνης και της zonula οκλουδίνης 1 (ZO-1) στο επιθήλιο της νήστιδας των χοίρων. Επιπρόσθετα, εντός των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων έχουν αναφερθεί οδοί μεταγωγής μηνυμάτων που εμπλέκουν ισομερή πρωτεϊνικών κινασών όπως η PKCδ οι οποίες εμπλέκονται και στην ενεργοποίηση του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου αλλά και στην οδό μεταγωγής μηνυμάτων των υποδοχέων toll like (Ulluwishewa *et al.*, 2011). Οι Huang και Lee, (2012), στη μελέτη τους αναφέρουν επίσης συσχέτιση της επίδρασης των φυτοβιοτικών επί των οδών μεταγωγής μηνυμάτων των υποδοχέων toll like με την έκφραση του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου και κατά συνέπεια με τη βελτίωση της εντερικής ακεραιότητας. Έτσι, η ελάττωση της έκφρασης των υποδοχέων toll like στο εντερικό επιθήλιο από τα φυτοβιοτικά πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα επίδραση επί της έκφρασης των πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες με τη σειρά τους θα προκαλούν αύξηση της έκφρασης

του συμπλόκου πρωτεϊνών στενού συνδέσμου και ευεργετικά αποτελέσματα επί της εντερικής ακεραιότητας.

Οι παραπάνω πιθανές προαναφερθείσες συσχετίσεις της επίδρασης των φυτοβιοτικών επί όλων των παραπάνω παραγόντων που σχετίζονται με την ενίσχυση της εντερικής ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου στα ορνίθια κρεοπαραγωγής συνοψίζονται για καλύτερη κατανόηση στο **Σχήμα 6**.



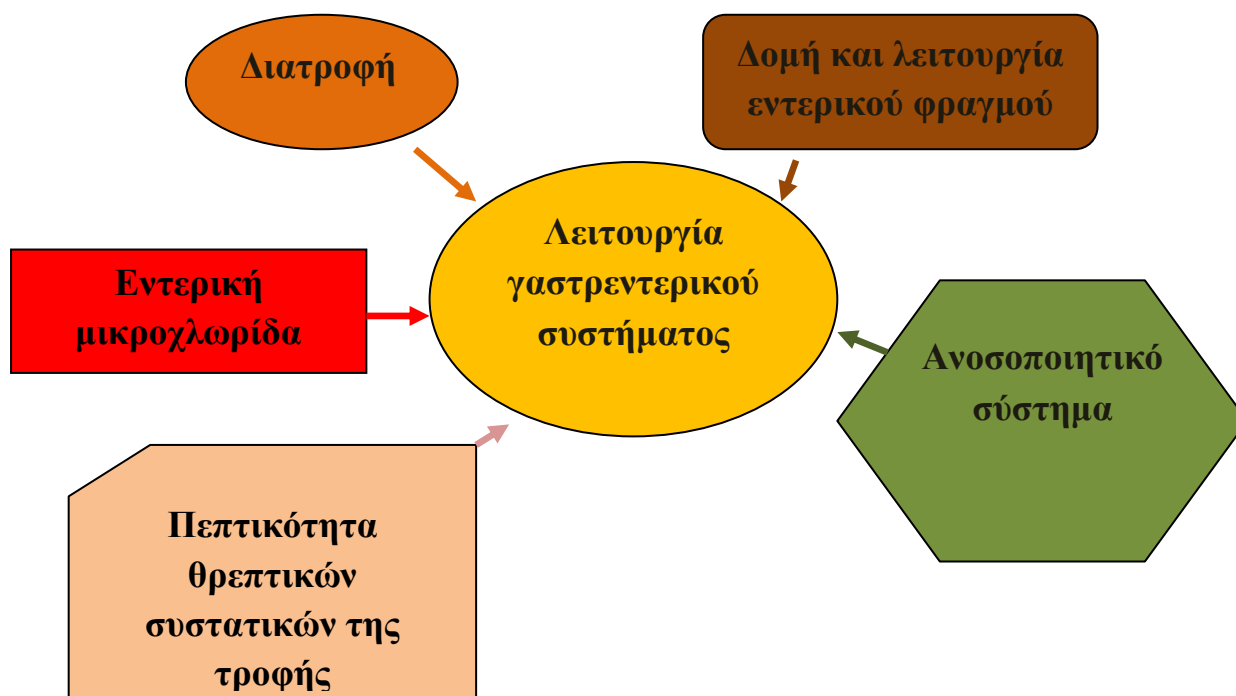
Σχήμα 6. Πιθανές επιδράσεις φυτοβιοτικών επί παραγόντων που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα στο εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παραγωγικότητα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την φυσιολογική λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος. Οι κυριότεροι παράγοντες που επιδρούν στην εύρυθμη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος και είναι απαραίτητο να διερευνηθούν σε μια μελέτη είναι: η διατροφή, η δομή και η λειτουργία του εντερικού φραγμού, παράγοντες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, η εντερική μικροχλωρίδα και η αλληλεπίδραση της με τον οργανισμό του πτηνού μέσω των μεταβολικών της δραστηριοτήτων και η πεπτικότητα και η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής (**Σχήμα 7**). Παρόλη την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των παραγόντων, η διερεύνηση όσο το δυνατόν περισσότερων παραμέτρων που σχετίζονται με αυτούς δύναται να αποδώσει :

α) μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα και νέα στοιχεία για τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος των ορνιθίων η οποία επηρεάζει άμεσα την παραγωγικότητα τους.

β) νέα στοιχεία αναφορικά με τους παράγοντες (σύσταση βασικού σιτηρεσίου, επίπεδο προσθήκης φυτογενών συστατικών) που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των φυτοβιοτικών ως προσθέτων υλών στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής.



Σχήμα 7. Παράγοντες που επηρεάζουν την φυσιολογική λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα (Celi et al., 2017)

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των προδιαγραφών του σιτηρεσίου σε ΜΕ και ΟΠ και του είδους του χορηγούμενου δημητριακού καρπού και της προσθήκης φυτοβιοτικών επί των παραγωγικών αποδόσεων και σημαντικών βιοχημικών και μοριακών (γονιδιακών) βιοδεικτών της φυσιολογικής εντερικής λειτουργίας και μικροχλωρίδας κρεοπαραγωγών ορνιθίων.

Με βάση προηγούμενη ερευνητική εμπειρία (Παρασκευάς Β. 2009, Mountzouris *et al.* 2011) και τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που προηγήθηκε προέκυψαν τα παρακάτω ερωτήματα-θέματα προς διερεύνηση:

1. Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του ΦΣ1 (μίγμα φυτογενών συστατικών βασισμένο σε αιθέρια έλαια ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών) και της διατήρησης σταθερού λόγου ΜΕ:ΟΠ με την ελάττωση των επιπέδων (συγκεντρώσεων) ενέργειας (ΜΕ) και πρωτεΐνης (ΟΠ) του σιτηρεσίου.

2. Μελέτη των επιπέδων προσθήκης (συγκέντρωσης) 2^{ου} φυτοβιοτικού ΦΣ2 (μίγμα φυτογενών συστατικών με κύρια συστατικά μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη) και αλληλεπίδραση του με το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού (αραβόσιτος-σιτάρι).
3. Μελέτη και τεκμηρίωση των επιδράσεων των ΦΣ1 και ΦΣ2 με προσδιορισμό συγκεκριμένων βιολογικών παραμέτρων της εντερικής μικροχλωρίδας και λειτουργίας σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο.
4. Επιβεβαίωση των επιδράσεων των ΦΣ1 και ΦΣ2 με τη βοήθεια των βιοδεικτών που επηρεάστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις.

Για την υλοποίηση του σκοπού και των στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες πέντε μελέτες που περιγράφονται περιληπτικά παρακάτω.

Μελέτη 1 (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4)

Ο στόχος της πρώτης μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της ελάττωσης των επιπέδων (συγκεντρώσεων) ενέργειας και πρωτεΐνης σε συνδυασμό με την προσθήκη του ΦΣ1 σε αναλογία 125 mg/kg σιτηρεσίου επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και στο κρέας ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Μελέτη 2 (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5)

Στη δεύτερη μελέτη πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των επιπέδων (συγκεντρώσεων) προσθήκης ΦΣ2 (0, 100, 150 mg / kg σιτηρεσίου) βασισμένο στα συστατικά μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη σε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο, επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και το κρέας καθώς επίσης και επί της σχετικής μοριακής έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων στο σπλήνα και στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Μελέτη 3 (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6)

Στην τρίτη μελέτη πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του ΦΣ2 του δεύτερου πειράματος σε τρεις συγκεντρώσεις (0, 100, 150 mg / kg σιτηρεσίου), σε σιτηρέσιο βασισμένο σε σιτάρι και σογιάλευρο και μελετήθηκε η επίδραση του επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και το κρέας καθώς επίσης και επί της σχετικής μοριακής έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων στο σπλήνα και στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

ΜΕΛΕΤΗ 4 (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7)

Σε αυτή τη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της ελάττωσης των επιπέδων (συγκεντρώσεων) ενέργειας και πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων σε συνδυασμό με την προσθήκη του ΦΣ1 επί της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας και της μοριακής έκφρασης στο εντερικό επιθήλιο βιοδεικτών όπως οι υποδοχείς toll-like, το σύμπλοκο πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, και προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών εκφραζόμενων σε δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες του τυφλού εντέρου.

ΜΕΛΕΤΗ 5 (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8)

Στην πέμπτη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του χρησιμοποιούμενου είδους δημητριακού καρπού (αραβόσιτος ή σιτάρι) σε συνδυασμό με τρεις συγκεντρώσεις προσθήκης ΦΣ2 επί της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας, και της μοριακής έκφρασης στο εντερικό επιθήλιο βιοδεικτών όπως οι υποδοχείς toll-like, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, το σύμπλοκο πρωτεϊνών στενού συνδέσμου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΜΕΛΕΤΗ 1

Τίτλος: Επίδραση της προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών και της ελάττωσης των επιπέδων ενέργειας και πρωτεΐνης επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ορνίθια κρεοπαραγωγής

4.1 Σκοπός

Η παρούσα μελέτη, βασίστηκε στην υπόθεση ότι το χρησιμοποιούμενο ΦΣ1 το οποίο βασίστηκε σε αιθέρια έλαια ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών σε συνδυασμό με τη διατήρηση σταθερού του λόγου ΜΕ προς ΟΠ, δύναται να βελτιώσει τις αρνητικές επιδράσεις της ελάττωσης των επιπέδων (συγκεντρώσεων) ΜΕ και ΟΠ σε σιτηρέσια των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ διατηρώντας σταθερό το λόγο τους (ΜΕ:ΟΠ), σε συνδυασμό με την προσθήκη ή μη ΦΣ1 με κύρια ενεργά συστατικά την καρβακρόλη, την ανηθόλη, και το λεμονένιο, επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών της τροφής, βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και στο κρέας ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις

Η πειραματική μελέτη διενεργήθηκε σε 450 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής (Cobb 500), ηλικίας μιας ημέρας, τα οποία είχαν εμβολιαστεί κατά της νόσου Marek, της λοιμώδους βρογχίτιδας και της ψευδοπανώλους. Ακολουθήθηκε πρόγραμμα διατροφής τριών σταδίων με το εναρκτήριο σιτηρέσιο να χορηγείται από την 1^η έως την 14^η ημέρα, το σιτηρέσιο ανάπτυξης από την 15^η έως την 28^η ημέρα και το σιτηρέσιο πάχυνσης από την 29^η έως την 42^η ημέρα. Για κάθε στάδιο καταρτίστηκαν τρεις τύποι σιτηρεσίου (Α, Β και C). Ο τύπος Α αποτέλεσε το σιτηρέσιο αναφοράς και καταρτίστηκε με βάση τις συστάσεις του προμηθευτή των ορνιθίων (Πτηνοτροφία-εκκολαπτήρια Λαλαγιάννης και ΣΙΑ ΕΕ, Ελλάδα) για μέγιστη απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Οι τύποι σιτηρεσίου Β και C, καταρτίστηκαν

έτσι ώστε να υπολείπονται συγκριτικά με το Α σε ΜΕ και ΟΠ κατά 3% και 6% (Πίνακας 4.1). Ο λόγος ΜΕ:ΟΠ διατηρήθηκε σταθερός σε όλους τους τύπους των σιτηρεσίων (Α, Β, C) και για κάθε στάδιο (εναρκτήριο, ανάπτυξης, πάχυνσης) του προγράμματος διατροφής τους, καθώς και τα συνολικά θειικά αμινοξέα (total sulfur amino acids, TSSA), τη θρεονίνη και την τρυπτοφάνη. Με βάση τα παραπάνω και σε συνδυασμό με την προσθήκη ή μη ΦΣ1 σε συγκέντρωση 0 ή 125 mg/kg τροφής, προέκυψαν οι 6 ακόλουθες πειραματικές επεμβάσεις (Α, ΑΦΣ1, Β, ΒΦΣ1, C, CΦΣ1), Α: σιτηρέσιο μάρτυρας, ΑΦΣ1: Α + 125 mg ΦΣ1 / kg τροφής, Β: σιτηρέσιο με ελαττωμένα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ κατά 3 % σε σύγκριση με το Α, ΒΦΣ1: Β + 125 mg ΦΣ1 / kg τροφής, C: σιτηρέσιο με ελαττωμένα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ κατά 6 % σε σύγκριση με το Α, CΦΣ1: C + 125 mg ΦΣ1 / kg τροφής. Όλοι οι τύποι σιτηρεσίων ήταν βασισμένοι σε αραβόσιτο-σογιάλευρο και χορηγήθηκαν σε μορφή αλέσματος. Το ΦΣ1 ήταν ένα μίγμα αιθέριων ελαίων ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών με κύρια ενεργά συστατικά την καρβακρόλη, την ανηθόλη και το λεμονένιο ενώ χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (Digestarom P.E.P., Biomin Holding GmbH, Getzersdorf, Austria). Επιπρόσθετα, το ΦΣ1 περιείχε τα ενεργά συστατικά σε συγκέντρωση 115 g/kg ΦΣ1, από τα οποία η καρβακρόλη είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (102 g/kg ΦΣ1). Σε εβδομαδιαία βάση, το ΦΣ1 αναμειγνυόταν με τους χρησιμοποιούμενους τύπους των σιτηρεσίων με φορέα τον αραβόσιτο. Τρία δείγματα τροφής για τα τρία αντίστοιχα διατροφικά στάδια αναλύθηκαν για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητά τους σε καρβακρόλη, η οποία έπρεπε να είναι μέσα στις προδιαγραφές του ΦΣ1 που προαναφέρθηκαν.

Τα ορνίθια μετά την παραλαβή τους ομαδοποιήθηκαν και κατανεμήθηκαν στις 6 προαναφερθείσες πειραματικές επεμβάσεις. Κάθε πειραματική επέμβαση αποτελούνταν από 5 επαναλήψεις των 15 ορνιθίων η κάθε μια. Τα ορνίθια τοποθετήθηκαν σε κελιά εμβαδού (1m²) στων οποίων το δάπεδο τοποθετήθηκε ριζοφλοιός. Εκτός της πρώτης ημέρας, εφαρμόστηκε πρόγραμμα φωτισμού 23 ώρες φως- 1 ώρα σκοτάδι. Το πείραμα διήρκεσε έξι εβδομάδες ενώ τροφή και νερό χορηγήθηκε στα ορνίθια κατά βούληση (*ad libitum*). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις πειραματισμού του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Αγροτικών Ζώων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πρωτόκολλο πειραματισμού σχεδιάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για αυτές τις περιπτώσεις (EC 43/2007; EU 63/2010) και αδειοδοτήθηκε από την Περιφέρεια Αττικής.

Πίνακας 4.1. Σύνθεση και χημική σύσταση (g/kg) του σιτηρεσίου των πειραματικών επεμβάσεων.

Συστατικά	Εναρκτήριο (1-14 ^η ημέρα)			Ανάπτυξης (15-28 ^η ημέρα)			Πάχυνσης (29-42 ^η ημέρα)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Αραβόσιτος (σπέρματα)	542.5	567.7	591.7	575.7	596.9	617.9	606.8	622.2	637.0
Σογιάλευρο (427 gr ΟΠ / kg)	310.7	320.0	330.0	268.1	282.8	297.9	233.6	256.2	280.0
Φυτική πρωτεΐνη (580 gr ΟΠ / kg) ¹	73.2	51.1	28.7	74.8	50.0	25.0	69.2	40.0	10.0
Φυτικό λίπος ²	40.3	26.5	13.5	50.2	37.4	24.9	60.0	49.2	38.7
Μαρμαρόσκονη	8.9	9.6	10.3	9.1	9.9	10.7	8.7	9.6	10.5
Φωσφορικό Μονασβέστιο	13.6	13.8	14.1	12.5	12.8	13.0	11.9	12.2	12.5
Αλάτι (NaCl)	3.9	4.1	4.3	3.1	3.4	3.6	2.9	3.2	3.5
L-λυσίνη HCl ³	0.5	0.8	1.0	0.2	0.5	0.7	0.5	0.8	1.1
DL-μεθειονίνη ⁴	2.2	2.2	2.2	2.1	2.1	2.1	2.3	2.4	2.4
L-θρεονίνη ⁵	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.3
Πρόμικτα Βιταμινών	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Πρόμικτα ανόργανων στοιχείων ⁷	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Κοκκιδιοστατικό ⁸	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0
Μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ1) ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Υπολογισμένη/ Προσδιορισμένη χημική σύσταση και ενέργεια σιτηρεσίων									
ΑΜΕ _n (MJ/kg σιτηρεσίου)	12.6	12.2	11.8	13.0	12.6	12.2	13.4	13.0	12.6
Ξηρά ουσία (g/kg σιτηρεσίου)	877.5	875.6	873.7	877.9	876.0	874.1	878.3	876.4	874.5
	(908.8)	(901.2)	(907.4)	(901.0)	(905.1)	(906.7)	(893.9)	(891.1)	(893.1)
Ολική πρωτεΐνη (g/kg)	220.0	213.4	206.8	205.0	198.9	192.7	190.0	184.3	178.6
	(215.2)	(209.6)	(202.3)	(201.2)	(196.1)	(189.0)	(187.9)	(182.0)	(175.8)
Λιπαρές ουσίες (g/kg)	70.0	56.3	43.3	80.0	67.2	54.5	89.7	78.5	67.7
	(69.9)	(56.4)	(42.6)	(81.7)	(69.8)	(56.4)	(88.9)	(77.4)	(65.1)
Ινώδεις ουσίες (g/kg)	36.1	36.6	37.0	33.9	34.6	35.3	32.1	33.1	34.1
Λυσίνη (g/kg)	13.0	12.6	12.2	11.7	11.4	11.0	10.9	10.6	10.3

Μεθειονίνη και Κυστεΐνη (g/kg)	9.6	9.3	9.0	9.1	8.9	8.6	8.9	8.6	8.4
Ασβέστιο (g/kg)	9.0	9.0	9.0	8.8	8.8	8.8	8.4	8.4	8.4
Φώσφορος (g/kg)	4.5	4.5	4.5	4.2	4.2	4.2	4.0	4.0	4.0
Νάτριο (g/kg)	2.0	2.0	2.0	1.7	1.7	1.7	1.6	1.6	1.6

¹ Φυτική πρωτεΐνη Nuevopro (Nuevo SA, Nea Artaki, Greece)

² Φυτικά υδρογονωμένο φοινικέλαιο με τριγλυκερίδια στεατίνης (Norel SA, Spain)

³ L-λυσίνη HCl 99% (Ajinomoto Eurolysine S.A.S, Paris, France).

⁴ DL-μεθειονίνη 99% (DSM Nutritional Products Ltd, Basel Switzerland).

⁵ L-θρεονίνη 98.5% (Ajinomoto Eurolysine S.A.S, Paris, France).

⁶ Το πρόμικγμα βιταμινών για το εναρκτήριο σιτηρέσιο και το σιτηρέσιο ανάπτυξης (Rovimix 11 Bro Basic, DSM, Netherlands) περιείχε ανά kg: 3,6 mg ρετινόλης (Βιταμίνη A), 100 µg χολοκαλσιφερόλης (Βιταμίνη D₃), 80 mg Βιταμίνη E, 9 mg μεναδιόνη (Βιταμίνη K₃), 3 mg θειαμίνη, 7 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 µg κυανοκοβαλαμίνη, 50 mg νικοτινικό οξύ, 15 mg παντοθενικό οξύ, 1,5 mg φυλλικό οξύ, 150 µg βιοτίνη. Το πρόμικγμα βιταμινών για το σιτηρέσιο πάχυνσης (Rovimix 12 Bro Basic, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 3.6 mg ρετινόλη (βιταμίνη A), 75 µg χολοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃), 50 mg βιταμίνη E , 7 mg μεναδιόνη (Βιταμίνη K₃), 3 mg θειαμίνη, 6 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 µg κυανοκοβαλαμίνη, 40 mg νικοτινικό οξύ, 12 mg παντοθενικό οξύ , 1,2 mg φυλλικό οξύ, 150 µg βιοτίνη.

⁷ Το πρόμικσμα ανόργανων στοιχείων (Rovimix Bro M, Roche, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 400 mg χλωριούχου χολίνης, 250 μg κοβάλτιο (Co), 1.5 mg ιώδιο (I), 300 μg σελήνιο (Se), 50 mg σίδηρο (Fe), 130 mg μαγγάνιο (Mn), 20 mg χαλκός (Cu) and 100 mg ψευδάργυρο (Zn).

⁸ Το κοκκιδιοστατικό (Clinacox 0.5%) προστέθηκε στο σιτηρέσιο ξεχωριστά από το ΦΣ1.

⁹ Το μίγμα φυτογενών συστατικών προστέθηκε στο σιτηρέσιο σε συγκέντρωση 125 mg/kg στις επεμβάσεις ΑΦΣ1, ΒΦΣ1 και CΦΣ1 αναμειγμένο με αραβόσιτο.

4.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, και πιο συγκεκριμένα ο ρυθμός αύξησης σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), η κατανάλωση τροφής (ΚΤ) και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ) προσδιορίζονταν μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 6 εβδομάδων της κάθε πειραματικής επέμβασης. Η θνησιμότητα καταγράφηκε σε καθημερινή βάση. Για πρακτικούς λόγους τα δεδομένα των παραγωγικών χαρακτηριστικών (ΡΑΣΒ, ΚΤ, ΣΕΤ) παρουσιάζονται ανά περίοδο ανάπτυξης (π.χ εναρκτήρια, ανάπτυξης, πάχυνσης). Επιπρόσθετα, ο ΡΑΣΒ, ΚΤ και ΣΕΤ υπολογίστηκαν και παρουσιάστηκαν συνολικά για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

4.2.3 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών

Ο προσδιορισμός της ολικής φαινομένης πεπτικότητας πραγματοποιήθηκε από την 35^η έως την 42^η ημέρα του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, την 35^η ημέρα 4 ορνίθια από κάθε κελί επιλέχθηκαν και μετακινήθηκαν άμεσα, έτσι ώστε 20 ορνίθια ανά επέμβαση να μοιραστούν σε 5 ομάδες και να τοποθετηθούν σε 4 κελιά σχεδιασμένα κατάλληλα για τον έλεγχο της πεπτικότητας του σιτηρεσίου κλωβοί με με διάτρητο δάπεδο και δίσκο συλλογής κόπρου). Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν, 4 επαναλήψεις των 5 ορνιθίων για κάθε επέμβαση. Κάθε κλωβός ελέγχου της πεπτικότητας ήταν εξοπλισμένο με 1 ταΐστρα στο μπροστινό του μέρος και 2 ποτίστρες, η μια στο δεξί

και η άλλη στο αριστερό μέρος αντίστοιχα. Πριν την κύρια πειραματική περίοδο συλλογής της κόπρου που είχε διάρκεια 3 ημέρες, έλαβε χώρα προηγήθηκε μια περίοδος προσαρμογής διάρκειας 4 ημερών απαραίτητη για την προσαρμογή των ορνιθίων στις νέες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της τριήμερης κύριας πειραματικής περιόδου, πραγματοποιήθηκε συλλογή κόπρου από το κάθε κελί 4 φορές την ημέρα (1 ανά 6 ώρες) με τα δείγματα να συλλέγονται σε σακούλες για αποθήκευση βιολογικού υλικού (biohazard) και να τοποθετούνται άμεσα στους -20°C . Το πτέρωμα και τα υπολείμματα της τροφής που παρέμεναν στους δίσκους συλλογής κόπρου, αφαιρέθηκαν προσεκτικά. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων της τροφής και της κόπρου σε θρεπτικά συστατικά ενώ το ουρικό οξύ και η ενέργεια αναλύθηκε σύμφωνα με την εργασία των Mountzouris et al. (2011).

4.2.4 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος

Την 42^η ημέρα του πειράματος, 10 ορνίθια από κάθε επέμβαση (2 ανά επανάληψη της κάθε επέμβασης), επιλέχθηκαν τυχαία και πραγματοποιήθηκε συλλογή ολικού αίματος από τη βραχιόνια αρτηρία. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν άμεσα σε πάγο, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα $2500 \times g$ για 10 λεπτά στους 4°C και το πλάσμα του αίματος αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναλύσεις.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χοληστερόλης, των ολικών πρωτεϊνών, της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος πραγματοποιήθηκε με βάσει τυποποιημένης μεθόδου με τα ενδεδειγμένα αντιδραστήρια Biosis LTD, Athens, Greece). Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) όπως αυτή περιγράφεται από τους Cao et al., 1999 και αφού συσχετίστηκε με την πρότυπη καμπύλη του αντιοξειδωτικού Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic acid) εκφράσθηκε σε mmol ισοδύναμων (equivalents) trolox ανά L πλάσματος αίματος (mmol TE /L πλάσματος αίματος).

4.2.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικής πρωτεΐνης στο κρέας

Την 42^η ημέρα του πειράματος, 10 ορνίθια από κάθε επέμβαση (2 ανά επανάληψη της κάθε επέμβασης), επιλέχθηκαν τυχαία και θανατώθηκαν. Στη συνέχεια, ελήφθησαν δείγματα ιστού του μείζονος θωρακικού και του δικέφαλου μηριαίου μυ και αποθηκεύτηκαν στους -80°C όπου και παρέμειναν για να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις. Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα από στήθος (*pectoralis major*) και μηρό (*biceps femoris*) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ORAC (Cao et al., 1999) ενώ οι τιμές εκφράστηκαν σε mmol ισοδύναμων (equivalents) Trolox ανά g ιστού (mmol TE/g ιστού). Για το σκοπό αυτό, αρχικά τα δείγματα κρέατος αλέστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου ηλεκτρικού ομογενοποιητή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αραίωση του δείγματος (κιμά) σε φωσφορικό διάλυμα (1g δείγματος:10 mL φωσφορικού διαλύματος) και στην συνέχεια ομογενοποίηση του (3 φορές x 3min). Τοποθέτηση από 1 mL σε 2 φιαλίδια τύπου erpendorf και φυγοκέντρηση που πραγματοποιείται σε 2 βήματα. Σε πρώτη φάση στις 10000g στους 4°C για 10 λεπτά στους, εξαγωγή υπερκείμενου, και σε δεύτερη φάση φυγοκέντρηση 50000g στους 4°C για 20 λεπτά, με το τελικό υπερκείμενο να συλλέγεται να αποθηκεύεται στους -80°C , μέχρι να χρησιμοποιήθει με τη βέλτιστη αραίωση στη μέθοδο ORAC.

Το υπερκείμενο του διαλύματος μετά από ομογενοποίηση των δειγμάτων από μηρό και στήθος μετά την αραίωση τους για την μέθοδο ORAC αναλύθηκαν και για το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Bradford (Bradford et al., 1976).

Στα δείγματα κρέατος από μπούτι και από στήθος, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε ολική πρωτεΐνη με την αναλυτική συσκευή Kjeltac 2300 analyser (Foss Tecator AB, Hoganas, Sweden; AOAC, 1991). Η χοληστερόλη στα δείγματα κρέατος από μηρό προσδιορίστηκε με την βοήθεια κατάλληλου ενζυματικού εμπορικού αντιδραστηρίου της εταιρείας Biosis E.Π.Ε (Αθήνα) (Biosis LTD, Athens, Greece).

4.2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη έγινε με το πρόγραμμα SPSS for Windows version 8.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) με το γενικό γραμμικό μοντέλο (general linear model)-γενική παραγοντική ανάλυση ANOVA (general factorial ANOVA procedure), με παράγοντες τον τύπο (ΤΣ) του σιτηρεσίου (Α, Β και C) και την προσθήκη του ΦΣ1 (0 και 125 mg/kg). Επιπρόσθετα, στα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας Kolmogorov – Smirnov. Οι διαφορές εξετάστηκαν περαιτέρω με τα κριτήρια του Tukey's honestly significant difference (HSD) multiple comparison procedure. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $P \leq 0.05$ και επίπεδο των στατιστικά σημαντικών τάσεων στο $P \leq 0.10$.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Ο τύπος του σιτηρεσίου και η προσθήκη του ΦΣ1 δεν είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση ($P > 0.05$) επί του ΡΑΣΒ και της ΚΤ, κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης και των φάσεων ανάπτυξης και πάχυνσης καθώς επίσης και συνολικά σε ολόκληρη τη διάρκεια του πειράματος (Πίνακας 4.2). Αναφορικά με το ΣΕΤ, στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά καλύτερο ΣΕΤ κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης ($P_{ΤΣ} = 0.021$) και κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος ($P_{ΤΣ} = 0.010$) συγκριτικά με τον ΣΕΤ των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ΦΣ1 παρουσίασε τάση να βελτιώσει το ΣΕΤ κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης ($P_{ΦΣ1} = 0.090$), της φάσης ανάπτυξης ($P_{ΦΣ1} = 0.057$) αλλά και καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ($P_{ΦΣ1} = 0.089$). Η θνησιμότητα καθόλη τη διάρκεια του πειράματος δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων και κατά μέσο όρο ήταν 3.56%.

4.3.2 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών

Η ολική φαινομένη πεπτικότητα της ξηράς ουσίας (ΞΟ), των αζωτούχων ουσιών (ΑΟ) αλλά και της φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας (ΑΜΕ), δεν επηρεάστηκαν ($P>0.05$) από τους εξεταζόμενους παράγοντες (**Πίνακας 4.3**). Τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε το σιτηρέσιο C παρουσίασαν υψηλότερη ($P_{T\Sigma}=0.046$) ολική φαινομένη πεπτικότητα λιπαρών ουσιών (ΛΟ) συγκριτικά με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε το σιτηρέσιο τύπου Β. Στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ($P_{T\Sigma \times \Phi\Sigma 1}=0.020$) παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο παραγόντων δηλαδή του τύπου σιτηρεσίου (ΤΣ) και της προσθήκης φυτογενούς συστατικού (ΦΣ1) για την ολική φαινομένη πεπτικότητα των ΛΟ.

4.3.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοχημικές παράμετροι στο πλάσμα του αίματος

Αναφορικά με τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ($P_{T\Sigma \times \Phi\Sigma 1}=0.035$) μεταξύ του ΤΣ και της προσθήκης του ΦΣ1 με τις επεμβάσεις ΒΦΣ1 και CΦΣ1 να μη διαφέρουν από τις τιμές στα ορνίθια της επέμβασης Α πριν την προσθήκη ΦΣ1. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά ($P_{T\Sigma}<0.001$) από τον ΤΣ, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε τύπος σιτηρεσίου Α να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Β και C. Τέλος η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($P_{\Phi\Sigma 1}<0.001$) με την προσθήκη ΦΣ1 (**Πίνακας 4.4**).

Η επίδραση του ΤΣ και του ΦΣ1 επί της συγκέντρωσης πρωτεΐνης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.4**. Στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ($P_{T\Sigma \times \Phi\Sigma 1}=0.002$) παρατηρήθηκε για την συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος με τα ορνίθια της επέμβασης ΒΦΣ1 να εμφανίζουν στατιστικά υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης συγκριτικά με αυτά της επέμβασης Β. Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε το σιτηρέσιο Α παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη

($P_{T\Sigma} < 0.001$) από εκείνη των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε το σιτηρέσιο C. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος μειώθηκαν ($P_{\Phi\Sigma 1} = 0.002$) με την προσθήκη $\Phi\Sigma 1$. Αναφορικά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων κρεοπαραγωγής αυτά δεν επηρεάστηκαν ($P > 0.05$) ούτε από τον TΣ ούτε από το $\Phi\Sigma 1$ (**Πίνακας 4.4**).

Πίνακας 4.2. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης (1-14^η ημέρα), της φάσης ανάπτυξης (15-28^η ημέρα), της φάσης πάχυνσης (29-42^η ημέρα) και συνολικά, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (1-42^η ημέρα)

Δεδομένα ¹	ΡΑΣΒ (g/ορνίθιο) ¹				ΚΤ (g/ορνίθιο) ¹				ΣΕΤ (g ΚΤ/g ΡΑΣΒ) ¹			
	1-14 ^η	15-28 ^η	29-42 ^η	1-42 ^η	1-14 ^η	15-28 ^η	29-42 ^η	1-42 ^η	1-14 ^η	15-28 ^η	29-42 ^η	1-42 ^η
Τύπος σιτηρεσίου (ΤΣ)²												
A	384.0	895.3	1167.9	2447.2	561.6	1384.0	2134.6	4080.2	1.47	1.55 ^B	1.83	1.68 ^B
B	386.9	892.6	1152.4	2431.9	563.7	1439.3	2172.1	4175.1	1.46	1.61 ^{AB}	1.89	1.72 ^{AB}
C	384.1	874.5	1125.0	2383.6	578.2	1420.5	2151.6	4150.3	1.51	1.62 ^A	1.91	1.74 ^A
Μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ1)³												
0	381.4	876.9	1152.2	2410.4	582.5	1417.4	2156.4	4156.4	1.53	1.62	1.88	1.73
125	388.7	898.1	1144.7	2431.4	553.1	1411.8	2149.2	4114.1	1.43	1.57	1.88	1.69
Αλληλεπιδράσεις (επεμβάσεις)												
A	374.8	868.9	1167.1	2410.8	576.3	1367.6	2109.6	4053.5	1.54	1.57	1.81	1.68
AΦΣ1	393.2	921.7	1168.7	2483.6	546.8	1400.3	2159.7	4106.8	1.40	1.52	1.85	1.65
B	387.6	885.2	1147.6	2420.4	578.5	1438.3	2176.7	4193.6	1.49	1.63	1.90	1.74
BΦΣ1	386.2	900.1	1157.1	2443.4	548.9	1440.3	2167.5	4156.6	1.43	1.60	1.88	1.70

C	381.6	876.6	1141.8	2400.0	592.8	1446.3	2182.9	4222.0	1.56	1.65	1.91	1.76
ΦΣ1	386.6	872.4	1108.2	2367.2	563.6	1394.8	2120.3	4078.7	1.46	1.60	1.92	1.72
SEM⁴	10.53	23.44	32.42	45.16	18.70	34.33	39.70	61.25	0.071	0.028	0.040	0.023
<i>P-value</i>												
ΤΣ	0.952	0.633	0.421	0.355	0.630	0.280	0.645	0.293	0.742	0.021	0.129	0.010
ΦΣ1	0.403	0.280	0.780	0.575	0.066	0.843	0.825	0.406	0.090	0.057	0.841	0.089
ΤΣ×ΦΣ1	0.634	0.476	0.781	0.514	1.000	0.474	0.380	0.294	0.861	0.886	0.719	0.955

¹ Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου αποτελούν τον αριθμητικό μέσο 10 επαναλήψεων για κάθε τύπο (πχ. 5 από Α+ 5 από ΑΦΣ1). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη ΦΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους από n=15 επαναλήψεις (πχ. 5 από ΑΦΣ1 + 5 από ΒΦΣ1+ 5 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική ($P<0.05$) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη (A, B) για τον τύπο σιτηρεσίου.

Εντός της ίδιας στήλης οι μέσοι με διαφορετικό εκθέτη (A, B) για τον τύπο σιτηρεσίου διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

² Τύπος σιτηρεσίου (A, B και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου Α είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου Β και C υπολείπονται του Α σε ενέργεια και πρωτεΐνη, κατά 3 και 6% αντίστοιχα.

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου)

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

Πίνακας 4.3. Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια (AME).

Δεδομένα ¹	Ξηρά Ουσία ¹	Λιπαρές ουσίες ¹	Αζωτούχες ενώσεις ¹	AME (Mj/kg) ¹
Τύπος σιτηρεσίου (ΤΣ)²				
A	72.6	64.4 ^{AB}	66.4	12.89
B	72.9	60.2 ^B	68.7	12.67
C	72.1	69.0 ^A	70.6	12.78
Μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ1)³				
0	73.3	66.0	69.2	12.89
125	71.8	63.0	68.0	12.67
Αλληλεπιδράσεις (επεμβάσεις)				
A	74.0	71.4 ^{ab}	68.0	13.34
AΦΣ1	71.2	57.4 ^b	64.8	12.44
B	72.9	60.7 ^{ab}	67.4	12.50
BΦΣ1	72.8	59.8 ^{ab}	70.1	12.84
C	72.8	66.0 ^{ab}	72.0	12.82
CΦΣ1	71.4	71.9 ^a	69.1	12.74
SEM⁴	1.47	3.23	4.59	0.273
P-value				
ΤΣ	0.874	0.046	0.669	0.720
ΦΣ1	0.241	0.270	0.760	0.350
ΤΣ×ΦΣ1	0.668	0.020	0.772	0.097

¹ Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου αντιπροσωπεύουν μέσους από n=8 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 4 από A+4 από AΦΣ1). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη ΦΣ αντιπροσωπεύουν μέσους από n=12 επαναλήψεις (πχ. 4 από AΦΣ1 + 4 από BΦΣ1+ 4 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P<0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη (A, B) για τον τύπο σιτηρεσίου, και (a, b, c) για τους μέσους των αλληλεπιδράσεων.

² Τύπος σιτηρεσίου (Α, Β και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου Α είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου Β και C υπολείπονται του Α σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα.

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου)

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

Πίνακας 4.4. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Λεδομένα ¹	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol TE/ L πλάσμα αίματος) ¹	Πρωτεΐνη (g/ dL πλάσμα αίματος) ¹	Χοληστερόλη (mg/ dL πλάσμα αίματος) ¹	Τριγλυκερίδια (mg/ dL πλάσμα αίματος) ¹
Τύπος σιτηρεσίου (ΤΣ)²				
A	13.67 ^A	5.93	182.65 ^A	65.64
B	11.50 ^B	6.16	166.32 ^{AB}	62.86
C	9.87 ^B	6.16	153.14 ^B	57.04
Μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ1)³				
0	10.42 ^x	5.95	177.44 ^y	64.63
125	12.93 ^y	6.22	157.30 ^x	59.06
Αλληλεπιδράσεις (επεμβάσεις)				
A	13.53 ^a	5.92 ^{ab}	186.00	65.66
AΦΣ1	13,80 ^a	5.95 ^{ab}	179.30	65.61
B	9.26 ^b	5.51 ^b	180.75	65.64
BΦΣ1	13.74 ^a	6.80 ^a	151.88	60.08
C	8.47 ^b	6.41 ^{ab}	165.56	62.59
CΦΣ1	11.26 ^{ab}	5.91 ^{ab}	140.71	51.49
SEM⁴	0.793	0.242	7.408	5.526

<i>P-value</i>				
ΤΣ	<0.001	0.568	0.001	0.292
ΦΣ1	<0.001	0.169	0.002	0.223
ΤΣ×ΦΣ1	0.035	0.002	0.289	0.609

¹ Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου αντιπροσωπεύουν μέσους από n=20 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 10 από την επέμβαση A+ 10 από την επέμβαση ΑΦΣ1). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη ΦΣ αντιπροσωπεύουν μέσους από n=30 επαναλήψεις (πχ. 10 από ΑΦΣ1 + 10 από ΒΦΣ1+ 10 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική ($P<0.05$) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη (A, B) για τον τύπο σιτηρεσίου, (x,y) για την προσθήκη ΦΣ1 και (a, b, c) για τους μέσους των αλληλεπιδράσεων.

² Τύπος σιτηρεσίου (A, B και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου A είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου B και C υπολείπονται του A σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα.

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου)

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, χοληστερόλη και ολική πρωτεΐνη στο μηρό και στο στήθος

Ο ΤΣ δεν είχε στατιστικά σημαντική ($P>0.05$) επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο μηρό και στο στήθος των ορνιθίων (**Πίνακας 4.5**). Αντίθετα, η προσθήκη του ΦΣ1 προκάλεσε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο στήθος ($P_{\Phi\Sigma1}<0.001$) και στο μηρό ($P_{\Phi\Sigma1}=0.010$) των ορνιθίων. Κανένας από τους δύο εξεταζόμενους παράγοντες δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ($P>0.05$) επί της συγκέντρωσης διαλυτής πρωτεΐνης στα δείγματα κρέατος στα οποία προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στα δείγματα από τον μηρό των ορνιθίων δεν επηρεάστηκε ($P>0.05$) ούτε από τον ΤΣ, ούτε από το ΦΣ1. Ο ΤΣ παρουσίασε στατιστικά σημαντική επίδραση επί της ολικής πρωτεΐνης στο στήθος των ορνιθίων, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε τύπος σιτηρεσίου A

και Β να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες ($P_{TS}=0.002$) τιμές συγκριτικά με αυτές των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C (Πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.5. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκέντρωση χοληστερόλης και πρωτεΐνης στο κρέας ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Δεδομένα ²	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol TE/g) ¹		Χοληστερόλη (mg/100g) ¹	Πρωτεΐνη - Kjeldahl (%) ¹	
	στήθος	μηρός	μηρός	στήθος	μηρός
Τύπος σιτηρεσίου (ΤΣ)²					
A	59.42	51.54	221.70	23.92 ^A	21.45
B	59.18	48.11	190.79	23.57 ^A	21.33
C	57.73	45.64	186.33	22.78 ^B	20.86
Μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ1)³					
0	53.62 ^x	44.46 ^x	206.43	23.53	21.16
125	63.94 ^y	52.40 ^y	192.78	23.32	21.27
Αλληλεπιδράσεις (επεμβάσεις)					
A	53.57	45.29	221.64	24.01	21.44
AΦΣ1	65.27	57.79	221.76	23.83	21.46
B	56.45	45.87	197.87	23.59	21.37
BΦΣ1	61.91	50.35	174.79	23.56	21.30
C	50.83	42.22	199.79	23.00	20.68
CΦΣ1	64.64	49.05	181.79	22.56	21.04
SEM⁴	3.473	3.633	15.534	0.315	0.338
P-value					
ΤΣ	0.871	0.273	0.054	0.002	0.190
ΦΣ1	0.001	0.010	0.287	0.411	0.698
ΤΣ×ΦΣ1	0.463	0.529	0.736	0.803	0.792

¹ Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου αντιπροσωπεύουν μέσους από n=20 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 10 από την επέμβαση A+ 10 από την επέμβαση AΦΣ1).

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη ΦΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους από

n=30 επαναλήψεις (πχ. 10 από ΑΦΣ1 + 10 από ΒΦΣ1+ 10 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική ($P<0.05$) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη (A, B) για τον τύπο σιτηρεσίου και (x,y) για την προσθήκη ΦΣ1.

² Τύπος σιτηρεσίου (A, B και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου A είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου B και C υπολείπονται του A σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα.

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου)

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.4 Συζήτηση – σχολιασμός

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της ελάττωσης των επιπέδων μεταβολιστέας ενέργειας (ME) και πρωτεΐνης (ΟΠ) σε συνδυασμό με την προσθήκη ενός μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ1), επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, επιλεγμένων βιοχημικών παραμέτρων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος και στο κρέας ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Ο τύπος του σιτηρεσίου δεν επηρέασε την ΚΤ των ορνιθίων στην παρούσα μελέτη. Η ελάττωση της ME κατά 2% (π.χ. από 3,000 σε 2,950 kcal/kg) με ταυτόχρονη διατήρηση της ΟΠ του σιτηρεσίου σταθερή, δεν επηρέασε επίσης την ΚΤ σε ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ΦΣ1 σε συγκέντρωση 100 mg/kg της τροφής (Bravo *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, η ΚΤ δεν επηρεάστηκε σε ακόμα 2 μελέτες στις οποίες τα σιτηρέσια διατηρήθηκαν ισοενεργειακά ενώ ταυτόχρονα η ΟΠ του σιτηρεσίου ελαττώθηκε κατά 3 (Kamran *et al.*, 2004) και 4% (Corzo *et al.*, 2005). Αντίθετα, η ελάττωση των επιπέδων ΟΠ κατά 32% (από 225 σε 153 g ΟΠ/kg σιτηρεσίου) με διατήρηση σταθερών των επιπέδων ME, σε ορνίθια 3 με 6 εβδομάδων προκάλεσε αύξηση της ΚΤ (Aletor *et al.*, 2000). Η ελάττωση, επίσης των επιπέδων ΟΠ κατά 6% (από 23 σε 17%) και των επιπέδων ME κατά 16% (από 3,146 σε 2,645 kcal/kg σιτηρεσίου), με ταυτόχρονη διατήρηση του λόγου ME:ΟΠ όπως και στην παρούσα μελέτη, αύξησε γραμμικά την ΚΤ στη φάση ανάπτυξης, πάχυνσης αλλά και συνολικά

καθόλη τη διάρκεια του πειράματος σε ορνίθια κρεοπαραγωγής (Kamran *et al.*, 2008). Προκύπτει ότι, από τους παράγοντες που μελετήθηκαν, αυτός του οποίου η επίπτωση είναι πιο μεγάλη είναι ο βαθμός ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων δύναται να θεωρηθεί ως ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την ποικιλία των παραπάνω αποτελεσμάτων (Aletor *et al.*, 2000).

Στην παρούσα μελέτη, τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C το οποίο ήταν καταρτισμένο με τις χαμηλότερες προδιαγραφές σε ΜΕ και ΟΠ συγκριτικά με το σιτηρέσιο A, παρουσίασαν τον υψηλότερο ΣΕΤ στην φάση ανάπτυξης και συνολικά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Προηγούμενες μελέτες, έδειξαν ότι η ελάττωση των επιπέδων ΟΠ στο σιτηρέσιο έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της τιμής του ΣΕΤ (Aletor *et al.*, 2000; Bregendahl *et al.*, 2002), ακόμα και όταν τα σιτηρέσια διατηρούνται ισοenerγειακά (Waldroup *et al.*, 2005). Είναι πιθανόν, η τιμή της περιεκτικότητας στην τροφή συγκεκριμένων μη απαραίτητων αμινοξέων να καθίσταται οριακή όταν τα επίπεδα ΟΠ στα σιτηρέσια περνάνε κάποιο συγκεκριμένο κατώτατο όριο. Η παραπάνω υπόθεση, δύναται να αποτελέσει και την εξήγηση της μειωμένης παραγωγικής απόδοσης που εκφράζεται με υψηλές τιμές ΣΕΤ σε ορνίθια στα οποία χορηγείται σιτηρέσιο με χαμηλά επίπεδα ΟΠ, ακόμα και όταν τα απαραίτητα αμινοξέα παρέχονται σε αυτά στα κατάλληλα επίπεδα (Berres *et al.*, 2010).

Επιπρόσθετα, από τη μελέτη των Kamran *et al.* (2008) προκύπτει ότι η ελάττωση των επιπέδων ΟΠ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων διατηρώντας σταθερή την αναλογία ΜΕ προς ΟΠ είχε ως αποτέλεσμα να προκύψει υψηλότερος ΣΕΤ στα ορνίθια σε όλες τις περιόδους ανάπτυξης εκτός της εναρκτήριας φάσης. Παρόμοια στην παρούσα μελέτη, τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε τύπος σιτηρεσίου C παρουσίασαν υψηλότερο ΣΕΤ κατά 4.3% στην εναρκτήρια φάση και κατά 3.5% συνολικά συγκριτικά με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου A. Πέραν των χαμηλότερων επιπέδων των απαραίτητων αμινοξέων στα σιτηρέσια τύπου C συγκριτικά με αυτά του τύπου A και άλλα μη απαραίτητα αμινοξέα όπως είναι η αργινίνη, η ισολευκίνη ή η βαλίνη, πιθανόν να κατέστησαν οριακά λόγω της ελάττωσης των επιπέδων της ΟΠ και να αποτελούν κατά συνέπεια πιθανή αιτία της αύξησης των τιμών του ΣΕΤ (Waldroup *et al.*, 2005; Kamran *et al.*, 2008) των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C συγκριτικά με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου A.

Αναφορικά με την προσθήκη ΦΣ1, έχει διαπιστωθεί ότι, η προσθήκη σε σιτηρέσια ορνιθίων μιγμάτων αιθέριων ελαίων τα οποία έχουν ως κύριο συστατικό την

καρβακρόλη έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ΚΤ (Lee *et al.*, 2003; Hashemipour *et al.*, 2013) χωρίς όμως επίδραση επί του ΡΑΣΒ (Botsoglou *et al.*, 2002; Barreto *et al.*, 2008; Akyurek and Yel, 2011) με άμεση συνέπεια την βελτίωση του ΣΕΤ (Lee *et al.*, 2003; Hashemipour *et al.*, 2013). Στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη ΦΣ1 δεν επηρέασε τον ΡΑΣΒ των ορνιθίων, όμως παρουσίασε τάση για μείωση της ΚΤ κατά 5.1% στην εναρκτήρια φάση του πειράματος. Επιπρόσθετα, τάσεις για βελτίωση του ΣΕΤ από την προσθήκη ΦΣ1 παρουσιάστηκαν, κατά 6.5% και 3.1% στην εναρκτήρια φάση και στη φάση ανάπτυξης αλλά και κατά 2.3% συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που παρουσιάστηκαν στα ορνίθια στα οποία δε τους χορηγήθηκε ΦΣ1 στο σιτηρέσιο. Επίσης, η προσθήκη ενός μίγματος αιθέριων ελαίων παρόμοιας σύστασης με αυτό της παρούσας μελέτης είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του ΣΕΤ (Mountzouris *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012) με ταυτόχρονη ελάττωση της ΚΤ και αύξηση του ΡΑΣΒ των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Γενικά, εκτός της διαφορετικής σύστασης των ΦΣ1, οι επιδράσεις τους επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών πιθανόν να οφείλονται και σε άλλους παράγοντες όπως η εφαρμοζόμενη δοσολογία, ο τύπος και η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου καθώς επίσης και οι συνθήκες εκτροφής (Ertas *et al.*, 2005).

Έχει αναφερθεί ότι, η πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών πιθανόν να σχετίζεται με το βαθμό ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ, την περιεκτικότητα σε αμινοξέα, το λόγο ΜΕ:ΟΠ καθώς επίσης την ηλικία και την γενετική προέλευση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Aletor *et al.*, 2000). Αναφορικά με τα αμινοξέα και τη συσχέτιση τους με τους συντελεστές πεπτικότητας, οι Ravindran *et al.* (2005) αναφέρουν ότι οι συντελεστές ολικής φαινομένης πεπτικότητας δύναται να επηρεάζονται από τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο αλλά και τη συγκέντρωση των αμινοξέων. Για παράδειγμα σε σιτηρέσια με χαμηλή περιεκτικότητα σε ΟΠ και αμινοξέα, η ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών εμφανίστηκε χαμηλότερη λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού ενδογενούς πρωτεΐνης στον ειλεό. Στην παρούσα μελέτη, ο τύπος του σιτηρεσίου δεν επηρέασε την ολική φαινομένη πεπτικότητα της ΞΟ, των ΑΟ και την ΑΜΕ. Παρόλα αυτά, ο τύπος σιτηρεσίου, επέδρασε επί της ολικής φαινομένης πεπτικότητας των ΛΟ. Πιο συγκεκριμένα, τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C παρουσίασαν υψηλότερες τιμές ολικής φαινομένης πεπτικότητας ΛΟ συγκριτικά με αυτές των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε τύπος σιτηρεσίου Β. Επιπρόσθετα, από την αλληλεπίδραση που εμφανίστηκε μεταξύ των δύο εξεταζόμενων παραγόντων δηλαδή του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης

ΦΣ1 για τον συντελεστή ολικής φαινομένης πεπτικότητας των ΛΟ, διαφαίνεται ότι η προσθήκη ΦΣ1 είχε πιθανόν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της πεπτικότητας των ΛΟ στην επέμβαση CΦΣ1, στην οποία το σιτηρέσιο που χορηγήθηκε ήταν χαμηλότερων προδιαγραφών συγκριτικά με την επέμβαση ΑΦΣ1 στην οποία το σιτηρέσιο ήταν βέλτιστων προδιαγραφών. Το αποτέλεσμα αυτό, πιθανόν υποδηλώνει ότι το ΦΣ1 μπορεί να βελτιώνει την πεπτικότητα των ΛΟ σε σιτηρέσια με χαμηλότερες των βέλτιστων προδιαγραφές σε ΜΕ και ΟΠ. Επιπρόσθετα, οι Aleator *et al.* (2000) διαπίστωσαν ότι η ΜΕ του σιτηρεσίου αξιοποιείται πιο αποτελεσματικά σε σιτηρέσια με χαμηλότερα επίπεδα ΟΠ συγκριτικά με τα σιτηρέσια με τα υψηλότερα επίπεδα ΟΠ προσδίδοντας πρόσθετο διατροφικό όφελος στα ορνίθια.

Η χορήγηση ΦΣ1 προκάλεσε σημαντική αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος κατά 19.4%. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με πολλές άλλες μελέτες στις οποίες διαπιστώθηκε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα αίματος ύστερα από χορήγηση φυτογενών προϊόντων (Goni *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Ciftci *et al.*, 2010; Polat *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος, η οποία μετρήθηκε με την μέθοδο ORAC, ύστερα από χορήγηση στο σιτηρέσιο των ορνιθίων θυμόλης, η οποία είναι ένα ισομερές της καρβακρόλης (Hoffman-Pennesi and Wu, 2010). Παρόμοια, η προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος συγκριτικά πάντα με την επέμβαση του μάρτυρα, με την επίδραση αυτή να εμφανίζει άμεση συσχέτιση με τη χορηγούμενη δόση του (Roofchaei *et al.*, 2011). Μια πιθανή εξήγηση αυτών των βελτιώσεων στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος που προκύπτει από την προσθήκη φυτοβιοτικών στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, αποτελεί η σύσταση τους σε ενεργά συστατικά και οι φαινολικές ΟΗ ομάδες αυτών οι οποίες παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται στην ιδιότητα τους να παρεμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες (ROS) που παράγονται στο πρώτο στάδιο οξείδωσης τους (Brenes and Roura, 2010; Polat *et al.*, 2011). Μια άλλη πιθανή εξήγηση της αύξησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος ύστερα από προσθήκη φυτοβιοτικών δύναται να αποτελεί η αύξηση της ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ciftci *et al.*, 2010; Roofchaei *et al.*, 2011).

Η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ είχε ως αποτέλεσμα, την μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων. Δοθείσης της αλληλεπίδρασης που παρατηρήθηκε μεταξύ του τύπου του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1, εξάγεται το συμπέρασμα ότι εντός του εύρους της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ, τα υψηλότερα επίπεδα αυτών διέγειραν την αντίσταση στην οξείδωση με το αποτέλεσμα αυτό να γίνεται ακόμα πιο αισθητό και με την προσθήκη ΦΣ1. Επιπρόσθετα, ενώ η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος παρουσιάστηκε ελαττωμένη στα σιτηρέσια με τις χαμηλότερες προδιαγραφές, η προσθήκη ΦΣ1 προκάλεσε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα σιτηρέσια με τις υψηλότερες προδιαγραφές σε ΜΕ και ΟΠ.

Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση πρωτεΐνης μετρήθηκε με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ και της προσθήκης ΦΣ1 επί των επιπέδων πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων στα οποία η τροφή χορηγήθηκε κατά βούληση. Διαπιστώθηκε ότι, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος δεν επηρεάστηκε από κανέναν από τους εξεταζόμενους παράγοντες (ΤΣ και ΦΣ1). Αναφορικά με τον τύπο του σιτηρεσίου τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες στις οποίες σιτηρέσια με χαμηλή περιεκτικότητα σε ΟΠ (Corzo *et al.*, 2005) συμπεριλαμβανομένων και σιτηρεσίων στα οποία ο λόγος ΜΕ:ΟΠ διατηρήθηκε σταθερός (Steiner *et al.*, 2008) δεν επηρέασαν την συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων. Αντίθετα, από την αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε μεταξύ του ΤΣ και της προσθήκης ΦΣ1 διαπιστώθηκε ότι όταν τα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ ελαττώθηκαν κατά 3%, η προσθήκη ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος κατά 19%. Δεδομένου ότι δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην ΚΤ, είναι πιθανόν, οι ιδιότητες των φυτογενών συστατικών να προστατεύουν τα κύτταρα και να παρεμποδίζουν την απόπτωση και εκφύλιση τους λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των παραγώγων οξείδωσης (Ghazalah and Ali., 2008) να δύναται να εξηγήσουν την αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης στο πλάσμα του αίματος που έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες (El- Ghousein *et al.*, 2009; Al-Jaff., 2011; Zhang *et al.*, 2013; Abou-Ekhair *et al.*, 2014; Alzawqari *et al.*, 2016).

Η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ, είχε ως συνέπεια την ελάττωση της συγκέντρωσης χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων, με τα ορνίθια εκείνα στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με εκείνα στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C κατά 16.2%. Η

συγκέντρωση της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος, μετρήθηκε στην παρούσα μελέτη προκειμένου να εκτιμηθούν οι υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες του χορηγούμενου ΦΣ1. Η προσθήκη του ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα ελάττωση της συγκέντρωσης χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος κατά 11.4%. Ελάττωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη μεγάλης ποικιλίας φυτοβιοτικών όπως αιθέριου ελαίου θυμαριού (Khaksar et al., 2012; Hosseini et al., 2013), αποξηραμένων φύλλων τσουκνίδας (Safamehr et al., 2012), αιθέριου ελαίου μέντας (Fallah et al., 2013), αιθέριων ελαίων δενδρολίβανου και σκόρδου (El-Latif et al., 2013), μίγματος αιθέριων ελαίων θυμαριού και γλυκάνισου (Cho et al., 2014) καθώς και μίγματος αποξηραμένου φλοιού εσπεριδοειδών (Alzawqari et al., 2016), όλων σε σιτηρέσια ορνιθίων. Επιπρόσθετα πρέπει να σημειωθεί ότι, η προσθήκη ΦΣ1 που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών παρόμοιο με αυτό της παρούσας μελέτης στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής προκάλεσε επίσης ελάττωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος (Hong et al., 2012). Αυτή η ελάττωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης αποδίδεται στην μείωση της έκφρασης της ενεργότητας της αναγωγής του HMG-Co A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) από ενεργά συστατικά των ΦΣ1 όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη (El-Ghousein et al., 2009; Hayati et al., 2011). Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει την ταχύτητα σύνθεσης της χοληστερόλης, καταλύοντας τη μετατροπή του HMG-Co A σε μεβαλονικό που στη συνέχεια μετατρέπεται σε χοληστερόλη και άλλα ισοπροπενοειδή. Στη μελέτη τους οι Ciftci et al. (2010) διαπίστωσαν ότι η παρεμπόδιση της αναγωγής του HMG-CoA είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της σύνθεσης της χοληστερόλης με τους παρεμποδιστές (πχ. καρβακρόλη και θυμόλη) να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην ελάττωση της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος στα περισσότερα είδη ζώων συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος δεν επηρεάστηκε ούτε από τον τύπο σιτηρεσίου ούτε από την προσθήκη ΦΣ1. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες (Soltan et al., 2008; Najafi and Torki, 2010) στις οποίες η προσθήκη ΦΣ1 στο σιτηρέσιο των ορνιθίων δεν παρουσίασε καμία επίδραση επί της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων. Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη η προσθήκη ΦΣ1 προκάλεσε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του κρέατος και πιο συγκεκριμένα στο στήθος και στο

μηρό κατά 16.1 και 15.2%, αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι, τα φυτοβιοτικά και ιδιαίτερα τα αιθέρια έλαια και τα μίγματα τους εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται με την οξείδωση του λίπους και είναι άμεσα εξαρτώμενες από την εφαρμοζόμενη δοσολογία χορήγησης στα σιτηρέσια των ορνιθίων (Lee *et al.*, 2004). Επίσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε δείγματα κρέατος από μηρό και στήθος ορνιθίων έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνεται με τη χορήγηση αιθέριων ελαίων ρίγανης σε μεγάλο αριθμό μελετών (Botsoglou *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2010; Hashemipour *et al.*, 2013). Η αύξηση αυτή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας είναι πιθανό να εξηγείται από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες διάφορων πολυφαινολικών συστατικών αιθέριων ελαίων όπως η καρβακρόλη στην παρούσα μελέτη, τα οποία περιέχονται σε αρκετά αρωματικά φυτά (πχ. ρίγανη) και στα αιθέρια έλαια τους, τα οποία παρουσιάζουν την ικανότητα να επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής των κυττάρων και να βελτιώνουν την ποιότητα του κρέατος καθυστερώντας την οξείδωση του λίπους (Botsoglou *et al.*, 2002; Brenes and Roura, 2010). Επιπρόσθετα, η προσθήκη στο σιτηρέσιο των ορνιθίων φυτικών αντιοξειδωτικών ενισχύει την σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών και ελαττώνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων στο κρέας των ορνιθίων λόγω της επίδρασης τους επί της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων που περιέχουν θείο όπως η αναγωγή και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Lopez-Bote *et al.*, 1998). Όπως αναμενόταν από τις προδιαγραφές των σιτηρεσίων στην παρούσα μελέτη, η ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική ελάττωση της περιεκτικότητας σε ολική πρωτεΐνη και στο στήθος του κρέατος, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης στο στήθος του κρέατος κατά 4.8 και 3.4% συγκριτικά με εκείνα στα οποία χορηγήθηκαν σιτηρέσια τύπου A και B, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία και με άλλες μελέτες στις οποίες η ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ στα σιτηρέσια ορνιθίων κρεοπαραγωγής είχε ως συνέπεια ελάττωση της περιεκτικότητας του κρέατος των ορνιθίων σε ολική πρωτεΐνη (Neto *et al.*, 2000; Kamran *et al.*, 2004; Laudadio *et al.*, 2012). Επιπρόσθετα, η ελάττωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο κρέας και πιο συγκεκριμένα στο μηρό των ορνιθίων ακολουθεί την ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου A να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές χοληστερόλης στο κρέας κατά 16% συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C.

Είναι εμφανές ότι, σιτηρέσια με χαμηλότερες προδιαγραφές σε επίπεδα ΜΕ και ΟΠ από τις βέλτιστες, παρόλο που είναι κατά βάση πιο οικονομικά, έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερες τιμές ΣΕΤ. Η προσθήκη ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τάσης βελτίωσης του ΣΕΤ, ενώ σε άλλη μελέτη στην οποία χορηγήθηκε ΦΣ1 παρόμοιας σύνθεσης με αυτό της παρούσης, ο ΣΕΤ βελτιώθηκε στατιστικά σημαντικά (Mountzouris *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012). Επομένως, το συνολικό οικονομικό όφελος από την κατάρτιση των σιτηρεσίων με χαμηλότερες προδιαγραφές από τις βέλτιστες σε ΜΕ και ΟΠ σε συνδυασμό με την δυνατότητα χρήσης προσθέτων διατροφής όπως τα φυτογενή συστατικά τα οποία δύναται να αντισταθμίζουν τις αρνητικές συνέπειες των σιτηρεσίων αυτών επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων, θα εξαρτάται αποκλειστικά από το κόστος των πρόσθετων αυτών.

Συμπερασματικά, από το αποτελέσμα της πρώτης μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής προκύπτει ότι η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και της συγκέντρωσης ΟΠ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων με ταυτόχρονη διατήρηση σταθερού του λόγου ΜΕ:ΟΠ επηρεάζει δυσμενώς τον ΣΕΤ των ορνιθίων, ενώ η προσθήκη 125 mg/kg ΦΣ1, προκάλεσε τάση να αντισταθμιστεί η δυσμενής αυτή επίδραση στην εναρκτήρια φάση, στη φάση ανάπτυξης αλλά και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ΦΣ1 βελτίωσε στατιστικά σημαντικά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα αίματος και στο κρέας και ελάττωσε τη συγκέντρωση χοληστερόλης στο πλάσμα αίματος των ορνιθίων συγκριτικά με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στα ορνίθια στα οποία δε χορηγήθηκε το ΦΣ1. Η προσθήκη του ΦΣ1 αντισταθμισε την αρνητική επίδραση των χαμηλών επιπέδων ΜΕ και ΟΠ και δύναται να αποτελέσει πιθανή επιλογή για το μέλλον η οποία να αξίζει περαιτέρω διερεύνηση (ακολουθεί στην τέταρτη μελέτη της παρούσας διδακτορικής διατριβής).

Το μεγαλύτερο μέρος της πρώτης μελέτης περιέχεται στη δημοσίευση: Paraskeuas *et al.*, 2016 (Παράρτημα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΜΕΛΕΤΗ 2

Τίτλος: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών επί των παραγωγικών αποδόσεων, της πεπτικότητας θρεπτικών των συστατικών, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, αιματολογικών βιοχημικών βιοδεικτών και της έκφρασης γονιδίων σε ορνιθία κρεοπαραγωγής στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο σε αραβόσιτο.

5.1 Σκοπός

Αναφορικά με τα βιοενεργά συστατικά των φυτοβιοτικών, έχει διαπιστωθεί ότι, φυτοβιοτικά με συστατικά την μενθόλη, της ανηθόλη και την ευγενόλη, ύστερα από προσθήκη τους στο σιτηρέσιο προάγουν την παραγωγική απόδοση των ορνιθίων (Erhan et al., 2012; Fallah et al., 2013; Hong et al., 2012) καθώς επίσης και την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών της τροφής (Amad et al., 2011; Khodhambashi Emami et al., 2012). Αντίθετα όμως, παρά τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες της μενθόλης, της ανηθόλης και της ευγενόλης (Petrovic et al., 2012), μεγάλη ποικιλία αποτελεσμάτων έχουν προκύψει σχετικά με τις επιδράσεις τους επί των συγκεντρώσεων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, πρωτεΐνης και γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος (Hong et al., 2012; Hosseinzadeh and Farhoomand, 2014) καθώς επίσης επί των επιδράσεων τους στο ανοσοποιητικό σύστημα των ορνιθίων (Hong et al., 2012; Kim et al., 2013; Toghyani et al., 2010). Επομένως και σύμφωνα με τα παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας μελέτης η διερεύνηση της επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) με βασικά βιοενεργά συστατικά την μενθόλη, την ανηθόλη και την ευγενόλη επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών της τροφής, επιλεγμένων βιοχημικών παραμέτρων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος και στο κρέας καθώς επίσης επί της σχετικής έκφρασης των κυτταροκινών σε δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως οι λεμφαδένες του τυφλού εντέρου και ο σπλήνας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις

Η πειραματική μελέτη διενεργήθηκε σε 225 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 ηλικίας μιας ημέρας, τα οποία αποκτήθηκαν από εκκολαπτήριο στην περιοχή της Αττικής (Πτηνοτροφία-εκκολαπτήρια Λαλαγιάννης και ΣΙΑ ΕΕ, Ελλάδα). Τα ορνίθια είχαν εμβολιαστεί κατά της νόσου Marek, της λοιμώδους βρογχίτιδας και της ψευδοπανώλους. Στη συνέχεια, διανεμήθηκαν τυχαία σε 3 πειραματικές επεμβάσεις με 5 επαναλήψεις των 15 ορνιθίων η καθεμία, για 6 εβδομάδες οι οποίες αποτέλεσαν και τη συνολική διάρκεια του πειράματος. Τα ορνίθια τοποθετήθηκαν σε κελιά εμβαδού (1m²) στον οποίον το δάπεδο τοποθετήθηκε ριζοφλοιός. Εκτός της πρώτης ημέρας, εφαρμόστηκε πρόγραμμα φωτισμού 23 ώρες φως- 1 ώρα σκοτάδι.

Εξαρτωμένης της προσθήκης ή μη ΦΣ2 στο βασικό σιτηρέσιο, προέκυψαν οι παρακάτω πειραματικές επεμβάσεις: ΦΣ2-0 (χωρίς προσθήκη ΦΣ2 στο βασικό σιτηρέσιο), ΦΣ2-100 (με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg / kg στο βασικό σιτηρέσιο) και ΦΣ2-150 (με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg / kg στο βασικό σιτηρέσιο). Όλοι οι τύποι σιτηρεσίων ήταν βασισμένοι σε αραβόσιτο-σογιάλευρο και χορηγήθηκαν σε μορφή αλέσματος. Ακολουθήθηκε πρόγραμμα διατροφής τριών σταδίων με το εναρκτήριο σιτηρέσιο να χορηγείται από την 1^η έως την 14^η ημέρα, το σιτηρέσιο ανάπτυξης από την 15^η έως την 28^η ημέρα και το σιτηρέσιο πάχυνσης από την 29^η έως την 42^η ημέρα (Πίνακας 5.1). Το ΦΣ2 το οποίο χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από ένα συνδυασμό διαφορετικών φυτογενών προϊόντων όπως αρωματικά βότανα, αιθέρια έλαια και άλλα εκχυλίσματα με συγκέντρωση βιοενεργού συστατικού στο ΦΣ2, 350 g/kg ΦΣ2. Επιπρόσθετα το ΦΣ2 περιείχε κυρίως αιθέρια έλαια μέντας (*Mentha arvensis*), γλυκάνισου (*Illicium verum*) και γαρύφαλλου (*Syzygium aromaticum*), αναμειγμένα με φορέα διοξειδίου του πυριτίου (silicium dioxide) και χλωριούχου νατρίου (sodium chloride). Το περιεχόμενο του ΦΣ2 σε στα παραπάνω αιθέρια έλαια προσδιορίστηκε με μέθοδο της European Pharmacopoeia 5.0 (EDQM, 2005).

Το πείραμα διήρκεσε έξι εβδομάδες ενώ τροφή και νερό χορηγήθηκε στα ορνίθια κατά βούληση (*ad libitum*). Σε εβδομαδιαία βάση, το ΦΣ2 αναμειγνυόταν με τους χρησιμοποιούμενους τύπους των σιτηρεσίων με φορέα τον αραβόσιτο. Το πείραμα

πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις πειραματισμού του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Αγροτικών Ζώων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πρωτόκολλο πειραματισμού ακολούθησε τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για αυτές τις περιπτώσεις (EC 43/2007; EU 63/2010) με σχετική άδεια από την Περιφέρεια Αττικής.

Πίνακας 5.1. Συστατικά (g/kg) και υπολογισμένη/προσδιορισμένη χημική σύσταση (g/kg σιτηρεσίου) του σιτηρεσίου.

Συστατικά	Σιτηρέσια βασισμένα σε αραβόσιτο		
	Εναρκτήριο (1-14 ^η ημέρα)	Ανάπτυξης (15-28 ^η ημέρα)	Πάχυνσης (29-42 ^η ημέρα)
Αραβόσιτος	540.6	570.0	607.8
Σογιάλευρο (460 g ολικής Πρωτεΐνης /kg σιτηρεσίου)	371.4	332.8	294.6
Σογιέλαιο	25.0	34.3	0.0
Φυτικό λίπος ^a	20.3	21.5	59.5
Μαρμαρόσκονη	13.5	13.0	12.2
Φωσφορικό μονοασβέστιο	16.2	15.6	14.4
Αλάτι (NaCl)	4.7	3.9	3.7
L-λυσίνη	1.1	1.3	1.2
DL-μεθειονίνη	2.6	2.7	2.4
L-θρεονίνη	0.0	0.27	0.25
Πρόμιγμα βιταμινών ^b	2.0	2.0	2.0
Πρόμιγμα ιχνοστοιχείων ^c	2.0	2.0	2.0
Κοκκιδιοστατικό (Monteban 100)	0.60	0.60	0.0
Μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) ^d	-	-	-
Υπολογισμένη χημική σύσταση			
AME _N , (MJ/kg σιτηρεσίου)	12.5	12.9	13.15
Ξηρά ουσία (g/kg)	883.6 (903.2)	884.0 (913.3)	883.2 (898.4)
Ολική πρωτεΐνη (g/kg)	215.0 (217.3)	200.0 (201.8)	185.0 (187.9)
Λιπαρές ουσίες (g/kg)	70.5 (73.0)	81.8 (82.1)	85.7 (84.5)
Ινώδεις ουσίες (g/kg)	32.1	31.0	29.9
Λυσίνη (g/kg)	12.4	11.6	10.5
Μεθειονίνη-Κυστεΐνη (g/kg)	9.2	8.9	8.2
Θρεονίνη (g/kg)	8.2	7.8	7.2
Ασβέστιο (g/kg)	10.0	9.6	9.0
Διαθέσιμος Φώσφορος (g/kg)	5.0	4.8	4.5
Νάτριο (g/kg)	2.0	1.7	1.6

^a Φυτικό λίπος προερχόμενο από επιλεκτικό διαχωρισμό φοινικέλαιου χωρίς χημική επεξεργασία σε σκόνη με 6% λεκιθίνη (BERGAFAT HTL-306, Berg & Schmidt, Hamburg, Germany)

^b Το πρόμιγμα βιταμινών για την εναρκτήρια και τη φάση ανάπτυξης (Rovimix 11 Bro Basic, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 3.6 mg ρετινόλης (Βιτ.Α), 100 μg χολοκαλσιφερόλη (Βιτ.Δ₃), 80 mg Βιτ.Ε, 9 mg μεναδιόνης (Βιτ.Κ₃), 3 mg θειαμίνη, 7 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 μg κυανοβαλαμίνη, 50 mg νικοτινικό οξύ, 15 mg παντοθενικό οξύ, 1.5 mg φυλλικό οξύ, 150 μg βιοτίνη. Το πρόμιγμα βιταμινών για τη φάση τελικής πάχυνσης (Rovimix 12 Bro Basic, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 3.6 mg ρετινόλης (Βιτ.Α), 75 μg χολοκαλσιφερόλη (Βιτ.Δ₃), 50 mg Βιτ.Ε, 7 mg μεναδιόνης (Βιτ.Κ₃), 3 mg θειαμίνη, 6 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 μg κυανοβαλαμίνη, 40 mg νικοτινικό οξύ, 12 mg παντοθενικό οξύ, 1.2 mg φυλλικό οξύ, 150 μg βιοτίνη.

^c Το πρόμιγμα ανόργανων στοιχείων (Rovimix Bro M, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 400 mg γλωριούχο χολίνη, 250 μg Co, 1.5 mg I, 300 μg Se, 50 mg Fe, 130 mg Mn, 20 mg Cu and 100 mg Zn.

^d Το μίγμα φυτογενών συστατικών που χορηγήθηκε (Digestarom[®] Poultry, Biomin Phytogenics GmbH, Germany) προστέθηκε στο σιτηρέσιο σε συγκέντρωση 100 και 150 mg/kg σιτηρεσίου με φορέα αραβόσιτο αντίστοιχα στο σιτηρέσιο κάθε φάσης.

5.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Βλ. κεφάλαιο 4.2.2

5.2.3 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών

Η ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών προσδιορίστηκε με τη χρήση του οξειδίου του χρωμίου (Cr₂O₃) ως δείκτη. Για την πραγματοποίηση του πειράματος πεπτικότητας το οξείδιο του χρωμίου προστέθηκε σε συγκέντρωση 0.5 g Cr₂O₃/kg σιτηρεσίου με φορέα το σιτάρι και αναμείχθηκε σε καθεμία από τις τρεις πειραματικές επεμβάσεις (ΦΣ2-0, ΦΣ2-100, ΦΣ2-150). Την 35^η ημέρα, 4 ορνίθια από κάθε κελί (20 ορνίθια ανά επέμβαση) μετακινήθηκαν και τοποθετήθηκαν τυχαία αφού μετρήθηκε πρώτα ο ΡΑΣΒ και η ΚΤ, σε κελιά πεπτικότητας ώστε να προκύψουν 4 επαναλήψεις των 5 ορνιθίων η καθεμία. Κάθε κελί πεπτικότητας είχε εσχαρωτό δάπεδο τέτοιο ώστε να διέρχεται η κόπρος άνετα από αυτό και ειδικά ταψιά συλλογής κόπρου. Το πείραμα πεπτικότητας πραγματοποιήθηκε σε δύο περιόδους μια περίοδο

προσαρμογής 4 ημερών και την περίοδο συλλογής που ήταν διάρκειας 3 ημερών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου συλλογής κόπρου, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 4 φορές την ημέρα ανά 6 ώρες με τα δείγματα να συλλέγονται και να τοποθετούνται άμεσα σε σφραγισμένες σακούλες στους -20°C . Η ποσότητα τροφής που έπεφτε εντός των ταψιών συλλογής κόπρου στο τέλος του πειράματος απομακρύνθηκε και ζυγίστηκε. Τα φτερά απομακρύνθηκαν επίσης με προσοχή από την κόπρο. Όλη η ποσότητα κόπρου που συλλέχθηκε ανά κελί πεπτικότητας αναμείχθηκε σαν μια επανάληψη. Τα δείγματα της τροφής και της κόπρου στη συνέχεια αναλύθηκαν με τις αναλύσεις ρουτίνας που πραγματοποιούνται σύμφωνα με τον AOAC (1984) για την ξηρά ουσία (7.007) και την τέφρα (7.009) έτσι ώστε να εκτιμηθεί η οργανική ουσία ενώ η ανάλυση των λιπαρών ουσιών πραγματοποιήθηκε χωρίς υδρόλυση με οξέα (7.060). Η ανάλυση των ινών ουσιών προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση του ANKOM 220 fibre analyser με σύστημα σακιδίων (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA). Η ολική πρωτεΐνη προσδιορίστηκε ως $6.25 \times \text{Kjeldahl}$ άζωτο (N) χρησιμοποιώντας την συσκευή ανάλυσης Kjeltac 2300 (Foss Tecator AB, Hoganas, Sweden). Για τον προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεΐνης στο ουρικό οξύ στην κόπρο έτσι ώστε να εκτιμηθεί κατά τον προσδιορισμό της ολικής πεπτικότητας της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Marquardt (1983). Η συνολική ενέργεια στην τροφή και στην κόπρο προσδιορίστηκε με τη χρήση αδιαβατικής θερμιδομετρικής οβίδας (Parr Instrument Co., Illinois, SA) η οποία τυποποιήθηκε με βενζοϊκό οξύ. Η συγκέντρωση του Cr_2O_3 στην τροφή και στην κόπρο προσδιορίστηκε μετά από μετατροπή των δειγμάτων σε τέφρα και πέψη τους με φωσφορικό οξύ-θειικό μαγγάνιο και βρωμικό κάλιο ενώ η ανίχνευση του πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης φλόγας σύμφωνα με τους Williams et al. (1962). Η διορθωμένη για το άζωτο φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια προσδιορίστηκε σε σχέση με τον δείκτη του Cr_2O_3 και διορθώθηκε σύμφωνα με τους Hill and Anderson (1958).

5.2.4 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος

Βλ. κεφάλαιο 4.2.4

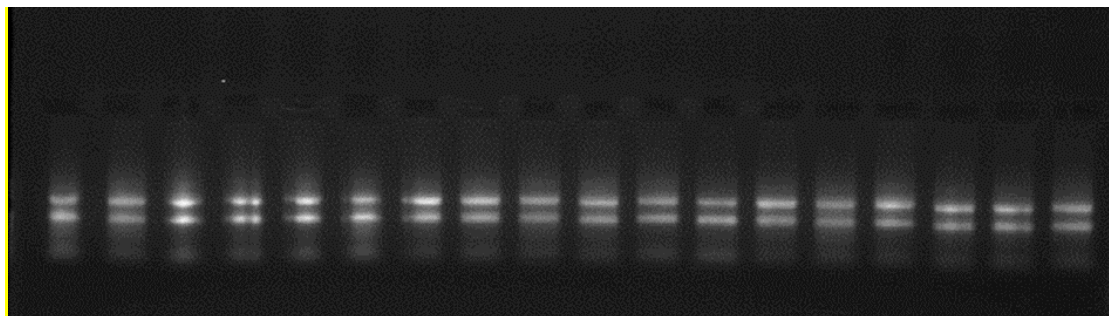
5.2.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (στήθος και μηρό)

Βλ. κεφάλαιο 4.2.5

5.2.6 Απομόνωση RNA και PCR αντίστροφης μεταγραφής

Κατά την 42^η ημέρα του πειράματος, 5 ορνίθια ανά επέμβαση επιλέχθηκαν τυχαία και οι λεμφαδένες τυφλού εντέρου καθώς επίσης και ο σπλήνας ελήφθησαν τηρώντας ασηπτικές συνθήκες και κατόπιν αποθηκεύτηκαν άμεσα στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω αναλύσεις. Ακολούθως, οι λεμφαδένες του τυφλού εντέρου και ο σπλήνας του κάθε ορνιθίου ομογενοποιήθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trifast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). Η ποσότητα του RNA προσδιορίστηκε σπεκτροφωτομετρικά (NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United Kingdom). Πριν την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA από το RNA που απομονώθηκε, πραγματοποιήθηκε καθαρίσμος του, με το ένζυμο DNase. Πιο συγκεκριμένα 10 mg RNA αντέδρασαν με 1 U από DNase I (M0303, New England Biolabs Inc, Ipswich, UK) μαζί με 10 mL από ρυθμιστικό διάλυμα 10xDNase για 1 ώρα στους 37°C . Η απενεργοποίηση της DNase πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1 mL από 0.5 mol/L ethylene diamine tetraacetic acid στους 75°C για 10 λεπτά. Για τον έλεγχο της καθαρότητας του RNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης.

Εικόνα 1. RNA μετά από καθαρισμό με DNase.



Για την σύνθεση του cDNA, σε 500 ng RNA από το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μετγραφή σε cDNA με τη βοήθεια του kit αντιδραστηρίων PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Shiga-Ken, Japan) σύμφωνα πάντα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Η ποσότητα cDNA για κάθε δείγμα που προέκυψε αποθηκεύθηκε στη συνέχεια στους -20°C .

5.2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real-time PCR)

Οι εκκινητές (primers) στα ορνίθια των γονιδίων για τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού (TGF- β 4), την επαγόμενη συνθετάση του NO (iNOS), τις ιντερλευκίνες IL-18, IL-2, IL-10, την ιντερφερόνη γ (IFN- γ) και του γονιδίου αναφοράς της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PerlPrimer program v.1.1.19 (Marshall, 2004) χρησιμοποιώντας αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών GenBank που είναι ελεύθερα διαθέσιμη και βρίσκεται υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α. και πιο συγκεκριμένα στο Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (NCBI) και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.2**. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να υβριδίζονται εντός της κωδικής περιοχής των μεταγραφόμενων γονιδίων. Επιπλέον, ο ένας από τους δύο εκκινητές επιλέχθηκε ώστε να υβριδίζεται και σε περιοχή ενδιάμεση εσωνίων και εξωνίων ώστε να εξασφαλιστεί η υβριδοποίηση ακόμα και στα πιο μικροσκοπικά τμήματα γενωμικού DNA. Στη συνέχεια οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου PRIMER BLAST σε σχέση με το γενωμικό υλικό του είδους *Gallus gallus* (όρνιθα) και των βάσεων δεδομένων mRNA έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπήρξε γενωμική επιμόλυνση και ότι υπήρξε γενωμικό υλικό μόνο από το συγκεκριμένο είδος ζώου. Επιπρόσθετα οι εκκινητές ελέγχθηκαν για την απόδοση της αντίδρασης (amplification efficiency), η οποία παρουσίασε διακύμανση με εύρος από 1.9 έως 2.0 για όλους τους εκκινητές ενώ τα αντίστοιχα R^2 (R squared, RSQ) παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροπλάκες 96 κελιών με τη βοήθεια μηχανήματος ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) όπως φαίνεται στην

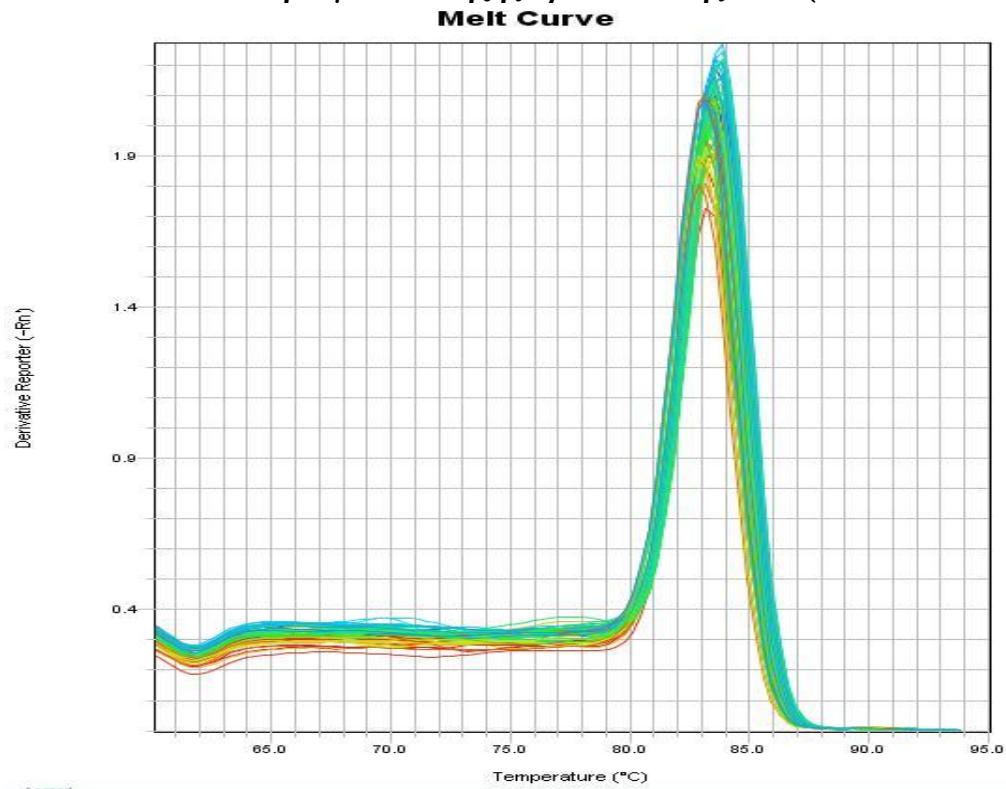
Εικόνα 2, και με τη χρήση του KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA).

Εικόνα 2. *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*



Κάθε αντίδραση περιείχε 12.5 ng RNA ισοδύναμων καθώς επίσης και 200 με 250 nmol/L αριστερού (forward) και δεξιού (reverse) εκκινητή για κάθε γονίδιο. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου – στόχου στους 95⁰ C για 3 λεπτά. Ακολούθησαν 40 κύκλοι των 95⁰ C για 5 δευτερόλεπτα, 60 ή 62⁰ C (ανάλογα με το γονίδιο στόχο) για 20 δευτερόλεπτα και 72⁰ C for 33 δευτερόλεπτα. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπυλών (melt curve analysis) ώστε να προσδιοριστεί η καθαρότητα των προϊόντων PCR που προέκυπταν από τις κορυφές των εξαγόμενων καμπυλών (**Εικόνα 3**). Κάθε δείγμα μετρήθηκε δύο φορές (duplicates). Οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων στόχων υπολογίστηκαν βάση της μελέτης του Pfaffl (2001) χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς.

Εικόνα 3. Ανάλυση καμπυλών τήξης προϊόντων της PCR (melt curve analysis)



Πίνακας 5.2. Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR.

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχίες εκκινητών (5'-3') ^A	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Αριθμός πρόσβασης Genbank
GAPDH	F: GCTGAATGGGAAGCTTACTG R: AAGGTGGAGGAATGGCTG	60°C	216	NM_204305.1
IFN-γ	F: AGCTCCCGATGAACGAC R: CAGGAGGTCATAAGATGCCA	62°C	151	NM_205149.1
TGF-β4	F: GGACGGATGAGAAGAAGCTG R: ACGGACCACCATATTGGA	62°C	296	M31160.1
IL 18	F: GTTGTTTCGATTTAGGGAAGGAG R: TCAAAGGCCAAGAACATTCC	60°C	146	NM_204608.1
IL 10	F: GACCAGCACCAGTCATCAG R: CCGTTCTCATCCATCTTCTCG	62°C	159	EF554720.1
IL 2	F: AGTCTTACGGGTCTAAATCACAC R: GGACAGCAGATTAGTTAGCCA	62°C	219	AF000631.1

iNOS	F: AAAGAAAGGGATCAAAGGTGGT	60°C	296	NM_204961.1
	R: CAAGCATCCTCTTCAAAGTCTG			

^A F:Forward (αριστερός εκκινητής), R:Reverse (δεξιός εκκινητής)

5.2.8 Στατιστική ανάλυση

Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου S.P.S.S. (Έκδοση 8.0.0 SPSS, Inc., Chicago, IL), με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και η γραμμική και τετραγωνική επίδραση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 με τη μέθοδο πολυωνυμικών συγκρίσεων. Επιπρόσθετα, στα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας Kolmogorov – Smirnov. Οι διαφορές εξετάστηκαν περαιτέρω με τα κριτήρια του Tukey's honestly significant difference (HSD) multiple comparison procedure. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $P \leq 0.05$ και επίπεδο των στατιστικά σημαντικών τάσεων στο $P \leq 0.10$.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Στην τελική φάση πάχυνσης, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού τετραγωνικού μοτίβο βελτίωσης του ΣΕΤ ($P=0.009$) με την επέμβαση ΦΣ2-100 να παρουσιάζει τις στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές ($P=0.007$) συγκριτικά με τις επεμβάσεις ΦΣ2-0 και ΦΣ2-150. Συνολικά, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 προκάλεσε την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού γραμμικού ($P=0.018$) και τετραγωνικού ($P=0.016$) μοτίβου αύξησης του ΡΑΣΒ, με τις επεμβάσεις ΦΣ2-100 και ΦΣ2-150 να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά ($P=0.007$) υψηλότερες τιμές συγκριτικά με αυτές της επέμβασης στην οποία δε χορηγήθηκε ΦΣ2. Τέλος, δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών επεμβάσεων και στις τρεις φάσεις του πειράματος για το ΡΑΣΒ και την ΚΤ, ενώ επιπρόσθετα και η βιωσιμότητα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις τρεις φάσεις του πειράματος αλλά και καθόλη τη διάρκεια αυτού (**Πίνακας 5.3**).

Πίνακας 5.3. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης (1-14^η), της φάσης ανάπτυξης (15-28^η), της φάσης πάχυνσης (29-42^η) και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (1-42^η).

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹			SEM ³	Στατιστική Ανάλυση ⁴		
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150		ANOVA	Πολυωνυμικές συγκρίσεις	
					P	P _{γραμμικό}	P _{τετραγωνικό}
Εναρκτήρια φάση (1-14 ^η ημέρα)							
ΡΑΣΒ ⁵	306	333	336	15.7	0.157	0.086	0.379
ΚΤ ⁵	431	457	465	21.2	0.285	0.136	0.636
ΣΕΤ ⁵	1.41	1.38	1.39	0.087	0.947	0.823	0.816
Βιωσιμότητα (%)	98.7	100.0	96.0	1.72	0.100		
Φάση ανάπτυξης (15-28 ^η ημέρα)							
ΡΑΣΒ	836	856	867	39.8	0.739	0.451	0.906
ΚΤ	1371	1380	1404	90.4	0.931	0.721	0.923

ΣΕΤ	1.64	1.61	1.63	0.098	0.954	0.872	0.799
Βιωσιμότητα (%)	100.0	100.0	98.4	1.36	0.397		
Φάση Πάχυνσης (29-42 ^η ημέρα)							
ΡΑΣΒ	1006	1122	1064	47.4	0.089	0.251	0.055
ΚΤ	1938	1962	2120	120.7	0.299	0.158	0.536
ΣΕΤ	1.93 ^{ab}	1.75 ^a	1.99 ^b	0.078	0.007	0.400	0.009
Βιωσιμότητα (%)	100.0	100.0	100.0	0.00	-		
Συνολικά (1-42 ^η ημέρα)							
ΡΑΣΒ	2149 ^a	2312 ^b	2267 ^b	42.7	0.007	0.018	0.016
ΚΤ	3740	3799	3989	179.5	0.381	0.191	0.681
ΣΕΤ	1.74	1.65	1.76	0.069	0.254	0.778	0.109
Βιωσιμότητα (%)	98.67	100.00	94.66	2.309	0.099	-	-

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με $n=5$ επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) στην ίδια γραμμή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P<0.05$).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

⁵ Ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), κατανάλωση τροφής (ΚΤ) και συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ)

5.3.2 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και συντελεστή φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένος για το άζωτο (AME_N)

Η αύξηση της προσθήκης ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού γραμμικού ($P=0.001$) και τετραγωνικού ($P=0.023$) μοτίβου αύξησης του συντελεστή φαινομένης πεπτικότητας για την ξηρά ουσία (ΞΟ) με την επέμβαση ΦΣ2-150 να εμφανίζει τις στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές ($P=0.001$) συγκριτικά με τις επεμβάσεις ΦΣ2-0 και ΦΣ2-100. Επιπρόσθετα, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 προκάλεσε την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού γραμμικού ($P=0.005$) μοτίβου αύξησης του συντελεστή μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένου για το άζωτο (AME_N), με την επέμβαση ΦΣ2-150 να εμφανίζει στατιστικά σημαντικά υψηλότερες ($P=0.013$) τιμές συγκριτικά με αυτές των επεμβάσεων ΦΣ2-0 και ΦΣ2-100 (Πίνακας 5.4).

Πίνακας 5.4. Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια διορθωμένη για το άζωτο (AME_N).

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹			SEM ³	Στατιστική ανάλυση ⁴		
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150		ANOVA	Πολυωνυμικές συγκρίσεις	
					P	P _{γραμμικό}	P _{τετραγωνικό}
Ολική φαινομένη πεπτικότητα (%)							
Ξηρά ουσία	73.9 ^a	73.9 ^a	77.1 ^b	0.65	0.001	0.001	0.023
Ολική πρωτεΐνη	73.2	77.1	76.7	4.98	0.823	0.503	0.621
Λιπαρές ουσίες	80.7	77.7	82.8	3.13	0.320	0.521	0.177
AME _N (MJ/kg)	13.2 ^a	13.4 ^{ab}	13.9 ^b	0.21	0.013	0.005	0.455

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με n= 4 επαναλήψεις των 5 ορνιθίων για κάθε επέμβαση. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) στην ίδια γραμμή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P<0.05).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

5.3.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοχημικές παράμετροι στο πλάσμα του αίματος

Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού γραμμικού ($P=0.031$) μοτίβου αύξησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος με την επέμβαση ΦΣ2-150 να εμφανίζει στατιστικά σημαντικά υψηλότερες ($P=0.048$) τιμές συγκριτικά με την επέμβαση ΦΣ2-0 στην οποία δεν χορηγήθηκε ΦΣ2. Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, γλυκόζης, τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος ορνιθίων 42 ημερών (Πίνακας 5.5).

Πίνακας 5.5. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, τριγλυκεριδίων, γλυκόζη και χοληστερόλης στο πλάσμα αίματος ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹			SEM ³	Στατιστική ανάλυση ⁴		
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150		ANOVA	Πολυωνυμικές συγκρίσεις	
					<i>P</i>	<i>P</i> _{γραμμικό}	<i>P</i> _{τετραγωνικό}
Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol TE/L) ⁵	10.4	10.9	13.0	1.14	0.048	0.031	0.461
Πρωτεΐνη (g/dl)	6.8	7.3	7.6	0.64	0.445	0.214	0.835
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	33.2	33.6	28.6	4.62	0.549	0.445	0.437
Γλυκόζη (mg/dl)	267.1	320.2	298.7	13.81	0.074	0.167	0.064
Χοληστερόλη (mg/dl)	118.0	105.4	138.3	22.30	0.073	0.153	0.068

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με n=10 ορνίθια ανά επέμβαση (πχ. 2 ορνίθια ανά επανάληψη). Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) στην ίδια γραμμή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P<0.05).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

⁵ Τα δεδομένα εκφράστηκαν σε mmol TE (ισοδύναμα trolox) /L πλάσματος αίματος.

5.3.4 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (στήθος και μηρός)

Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά ($P>0.05$) την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο μπούτι και στο στήθος των ορνιθίων (Πίνακας 5.6).

Πίνακας 5.6. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο κρέας ορνιθίων 42 ημερών.

Παράγοντες ²		Επεμβάσεις ¹			SEM ³	Στατιστική ανάλυση ⁴		
		ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150		ANOVA	Πολυωνυμικές συγκρίσεις	
						<i>P</i>	<i>P</i> _{γραμμικό}	<i>P</i> _{τετραγωνικό}
Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol/g) ⁵	στήθος	37.4	43.1	38.1	3.73	0.259	0.836	0.106
	μηρός	31.6	34.1	35.3	3.73	0.600	0.327	0.832

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με n=10 ορνίθια ανά επέμβαση (πχ. 2 ορνίθια ανά επανάληψη). Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) στην ίδια γραμμή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

⁵ Τα δεδομένα εκφράστηκαν σε mmol TE (ισοδύναμα trolox) /L κρέατος).

5.3.5 Κυτταροκίνες

Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκε η σχετική έκφραση των TGF- β 4, IFN- γ , IL-10, IL-18, IL-2 και iNOS στον σπλήνα και στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών (**Πινάκας 5.7**). Η σχετική έκφραση της ιντερλευκίνης IL-10 στο σπλήνα ήταν χαμηλή με τιμές για το κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct) υψηλότερες από 30 έτσι δεν συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις. Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό γραμμικό ($P=0.027$) μοτίβο μείωσης της σχετικής έκφρασης της ιντερλευκίνης IL-18 στο σπλήνα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σχετική έκφραση των TGF- β 4, IL-2, IFN- γ και iNOS στο σπλήνα μεταξύ των επεμβάσεων (**Πινάκας 5.7**). Επιπρόσθετα, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 δεν επηρέασε τις τιμές σχετικής έκφρασης των γονιδίων TGF- β 4, IFN- γ , IL-10, IL-18, IL-2 και iNOS στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου (**Πίνακας 5.7**).

Πίνακας 5.7. Σχετική γονιδιακή έκφραση TGF-β4, IL-18, IL-10, iNOS, IL-2 and IFN-γ στο σπλήνα και στους λεμφικούς αδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών.

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹			SEM ³	Στατιστική ανάλυση ⁴		
					ANOVA	Πολωνομικές συγκρίσεις	
					<i>P</i>	<i>P</i> _{γραμμικό}	<i>P</i> _{τετραγωνικό}
Σπλήνας	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150				
TGF-β4 ⁵	0.96	0.77	0.88	0.135	0.391	0.575	0.217
IL-18	1.09	0.76	0.59	0.201	0.074	0.027	0.666
iNOS	1.61	0.87	0.51	0.579	0.193	0.081	0.714
IL-2	1.00	0.73	1.08	0.228	0.326	0.732	0.152
IFN-γ	1.93	0.95	1.04	0.584	0.307	0.152	0.311
Λεμφαδένες τυφλού εντέρου							
TGF-β4	1.02	1.27	0.90	0.326	0.537	0.729	0.298
IL-10	1.43	0.97	0.66	0.378	0.170	0.066	0.830
IL-18	0.88	1.13	1.51	0.738	0.701	0.411	0.927
iNOS	1.47	0.90	1.60	0.632	0.523	0.848	0.271
IL-2	1.15	1.17	1.20	0.369	0.989	0.886	0.993

IFN-γ	0.96	1.27	1.22	0.332	0.481	0.456	0.539
-------	------	------	------	-------	-------	-------	-------

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με n=5 ορνίθια ανά επέμβαση. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) στην ίδια γραμμή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P<0.05).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

⁵ Ο υπολογισμός των τιμών των σχετικών εκφράσεων των γονιδίων στόχων πραγματοποιήθηκε βάση του Pfaffl et al. (2001) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς GAPDH.

5.4 Συζήτηση – σχολιασμός

Στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη ΦΣ2 παρουσίασε ευεργετικές επιδράσεις επί του ΣΕΤ στη φάση πάχυνσης και συνολικά επί του ΡΑΣΒ. Ευεργετικές επιδράσεις από την προσθήκη στο σιτηρέσιο των ορνιθίων αιθέριων ελαίων γλυκάνισου, γαρύφαλλου και μέντας έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Ciftci et al., 2005; Ertas et al., 2005; Hong et al., 2012). Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με το συμπέρασμα που προέκυψε από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση στο **κεφάλαιο 2.3.1** στο οποίο προσθήκη των φυτοβιοτικών, φάνηκε να βελτιώνει τον ΣΕΤ των παχυνόμενων ορνιθίων, στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων μελετών κυρίως λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων επί του Ρ.Α.Σ.Β., και σε λιγότερες μελέτες επί της ελάττωσης της Κ.Τ. Παρόλα αυτά και ειδικότερα για τα συστατικά του ΦΣ2 της παρούσας μελέτης, η προσθήκη μενθόλης και ανηθόλης σε σιτηρέσια ορνιθίων έχει διαπιστωθεί σε ορισμένες μελέτες ότι δεν προκάλεσε αύξηση του ΡΑΣΒ (Amad et al., 2011; Erhan et al., 2012; Ocak et al., 2008).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι βελτιώσεις του ΣΕΤ των ορνιθίων από την προσθήκη φυτοβιοτικών με παρόμοια σύσταση με αυτό της παρούσας μελέτης, δύναται να προκύπτουν ως αποτέλεσμα επίδρασης αυτών όχι μόνο επί του ΡΑΣΒ αλλά και επί της ΚΤ (Brenes and Roura, 2010). Παρόλα αυτά η ΚΤ δεν επηρεάστηκε στην παρούσα μελέτη από την αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2. Παρά το γεγονός ότι, η μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη αναφέρονται ως διεγερτικά της όρεξης στα ορνίθια (Frankic et al., 2009; Kumar et al., 2014), η επίδραση τους επί της ΚΤ στα ορνίθια είναι αμφιλεγόμενη. Πιο συγκεκριμένα, η ΚΤ ελαττώθηκε (Erhan et al., 2012), δεν επηρεάστηκε (Amad et al., 2011; Ciftci et al., 2005; Ertas et al., 2005) ή ακόμα και αυξήθηκε (Khodhambashi Emami et al., 2012) ύστερα από χορήγηση στο σιτηρέσιο των ορνιθίων μενθόλης ή/και ανηθόλης. Έτσι παράγοντες όπως τα επίπεδα προσθήκης φυτοβιοτικών, τα βιοενεργά συστατικά τους (όπως η μενθόλη, η ανηθόλη, η ευγενόλη κ.ά) και η σύσταση του σιτηρεσίου όπως είδαμε και στην εισαγωγή αυτής της διδακτορικής διατριβής πιθανόν να μπορούν να εξηγήσουν την ποικιλομορφία των παραπάνω αποτελεσμάτων (Hong et al., 2012; Ocak et al., 2008).

Η προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg / kg προκάλεσε βελτίωση του ΣΕΤ στην φάση τελικής πάχυνσης στην παρούσα μελέτη κατά 9.3% συγκριτικά με τις τιμές

ΣΕΤ που παρατηρήθηκαν για την επέμβαση ΦΣ2-0 στην οποία δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη ΦΣ2. Επιπρόσθετα, από το τετραγωνικό μοτίβο που παρουσιάστηκε για το ΣΕΤ με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 για το ΣΕΤ της φάσης πάχυνσης, διαπιστώθηκε ότι το ΣΕΤ στην επέμβαση ΦΣ2-150 ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτό της επέμβασης ΦΣ2-100 και δεν διέφερε από αυτό του μάρτυρα, δηλαδή της επέμβασης ΦΣ2-0.

Η αναγκαιότητα της βελτιστοποίησης των επιπέδων προσθήκης των φυτοβιοτικών όπως είδαμε και στο πρώτο κεφάλαιο της εισαγωγής, έτσι ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της χορήγησης τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων, και ειδικότερα η αποτελεσματικότητα της επίδρασης τους επί των παραγωγικών αποδόσεων τους έχει διερευνηθεί σε αρκετές μελέτες (Faix et al., 2009; Mountzouris et al., 2011; Traesel et al., 2011; Hashemipour et al., 2013). Έχει διαπιστωθεί ότι φυτοβιοτικά που περιείχαν μενθόλη (πχ., βότανα ή αιθέρια έλαια) προκαλούν βελτίωση του ΣΕΤ (Erhan et al., 2012; Fallah et al., 2013). Επιπρόσθετα, η προσθήκη στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής, αιθέριου ελαίου γλυκάνισου (Ciftci et al., 2005; Soltan et al., 2008) και αιθέριου ελαίου γαρύφαλλου (Ertas et al., 2005) έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί βελτίωση στο ΣΕΤ.

Αυτές οι βελτιώσεις του ΣΕΤ, λόγω της προσθήκης των παραπάνω φυτοβιοτικών πιθανόν να μπορούν να αποδοθούν στις βελτιώσεις που προκαλούνται εξίσου από αυτά ύστερα από την προσθήκη τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων επί της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου. Παραδείγματος χάρη, έχουν διαπιστωθεί περιπτώσεις στις οποίες έχει παρατηρηθεί η παραπάνω συσχέτιση βελτίωσης ΣΕΤ-βελτίωσης πεπτικότητας θρεπτικών συστατικών, ύστερα από προσθήκη στο σιτηρέσιο των ορνιθίων αιθέριων ελαίων γλυκάνισου (Amad et al., 2011), μέντας (Hernandez et al., 2004; Khodhambashi Emami et al., 2012) καθώς επίσης και θυμαριού (Cho et al., 2014). Στην παρούσα μελέτη η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 προκάλεσε αύξηση του συντελεστή φαινομένης πεπτικότητας της ξηράς ουσίας και του AME_N , με την επέμβαση ΦΣ2-150 να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές για την πεπτικότητα της Ξηράς ουσίας και του AME_N κατά 4.2% και 5.0% αντίστοιχα συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές της επέμβασης του μάρτυρα ΦΣ2-0. Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με το γραμμικό μοτίβο αύξησης που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 για το ΡΑΣΒ συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσας μελέτης, σχετικά με την πεπτικότητα

της ξηράς ουσίας και του AME_N αλλά με τη χρησιμοποίηση διαφορετικού μίγματος φυτογενών συστατικών (αυτού του πρώτου πειράματος, ΦΣ) είχαν διαπιστωθεί και σε προηγούμενη μελέτη (Mountzouris et al., 2011). Γενικότερα οι βελτιώσεις στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και της ενέργειας που προκαλούνται από την προσθήκη φυτοβιοτικών σε σιτηρέσια ορνιθίων, πιθανόν να οφείλονται στις ιδιότητες του να προάγουν τη διαδικασία της πέψης ενισχύοντας την έκκριση πεπτικών παγκρεατικών αλλά και εντερικών ενζύμων όπως η αμυλάση, η λιπάση, η τρυψίνη και η χυμοτρυψίνη (Lee et al., 2003; Lee et al., 2004; Brenes and Roura, 2010).

Ο ρόλος της μενθόλης, της ανηθόλης και της ευγενόλης ως παράγοντες οι οποίοι ενισχύουν τη διαδικασία της πέψης έχει αναφερθεί και από άλλες μελέτες (Frankic et al., 2009; Kumar et al., 2014). Η προσθήκη φυτοβιοτικών σε σιτηρέσια ορνιθίων τα οποία περιείχαν ανηθόλη ως ένα από τα βιοενεργά συστατικά τους έχει διαπιστωθεί ότι βελτιώνει την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου (Amad et al., 2011). Επιπρόσθετα, τα αιθέρια έλαια μέντας έχει διαπιστωθεί ότι βελτιώνουν και αυτά την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Hernandez et al., 2004; Khodhambashi Emami et al., 2012), μέσω της ρύθμισης της μικροβιακής χλωρίδας στο έντερο των ορνιθίων (Erhan et al., 2012), και πιο συγκεκριμένα είτε ενισχύοντας των πολλαπλασιασμό ωφέλιμων βακτηρίων για το εντερικό περιβάλλον όπως αυτά του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Mountzouris et al., 2011; Franciosini et al., 2015; Hashemipour et al., 2016). είτε προκαλώντας ελάττωση βακτηριακών πληθυσμών δυνητικά παθογόνων βακτηρίων όπως αυτών των *Clostridium perfringens* και *Escherichia coli* (Hashemipour et al., 2016). Επομένως η βελτίωση των προαναφερθέντων ζωοτεχνικών παραμέτρων δηλαδή του ΡΑΣΒ και του ΣΕΤ στην παρούσα μελέτη, δύναται μερικώς να εξηγηθεί από τις βελτιώσεις που προκλήθηκαν από την προσθήκη του ΦΣ2 επί της πεπτικότητας της ξηράς ουσίας και του AME_N.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 παρουσιάζοντας γραμμικό μοτίβο αύξησης. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος παρουσιάστηκαν υψηλότερες στην επέμβαση ΦΣ2-150 κατά 20% συγκριτικά με αυτές της που παρουσιάστηκαν στην επέμβαση ΦΣ2-0. Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών στις οποίες οι προσθήκες διαφόρων φυτοβιοτικών προκάλεσαν βελτιώσεις της αντιοξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα αίματος των ορνιθίων (Ciftci et al., 2010; Hoffman-Pennesi and Wu, 2010; Polat et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα οι

αντιοξειδωτικές ιδιότητες της μενθόλης, της ανηθόλης και της ευγενόλης αναφέρονται και σε άλλες μελέτες (Kamkar et al., 2010; Kim et al., 2013). Επιπρόσθετα, στη μελέτη των Petrovic et al. (2012) αναφέρεται ότι η προσθήκη αιθέριων ελαίων γαρύφαλλου προκάλεσε την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα χρησιμοποιηθέντα φυτοβιοτικά. Η αύξηση αυτή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος με την προσθήκη φυτοβιοτικών όπως αναφέρεται στη μελέτη των Polat et al. (2011) αλλά και στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής δύναται να αποδοθεί στα ενεργά συστατικά των φυτοβιοτικών και τις φαινολικές ομάδες τις οποίες αυτά περιέχουν οι οποίες είναι γνωστό ότι ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική επίδραση. Επιπρόσθετα, η αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος δύναται να αποδοθεί και στην αύξηση της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ciftci et al., 2010), όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που προκαλείται με την προσθήκη φυτοβιοτικών (Faix et al., 2009; Hashemipour et al., 2013; Akbarian et al., 2014) στο σιτηρέσιο των ορνιθίων. Επίσης, η ομοιόσταση διατηρείται από την ισορροπία στον οργανισμό του προ-οξειδωτικού συστήματος από το οποίο παράγονται ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικού συστήματος στο οποίο αυτές οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται και κάθε διαταραχή αυτής της ισορροπίας προς την πλευρά του προ-οξειδωτικού συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οξειδωτικού stress (Lin et al., 2004). Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, ο ρόλος των φυτοβιοτικών δύναται να είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση της υγείας των ορνιθίων λόγω των επιδράσεων των φυτοβιοτικών επί της αντιοξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα του αίματος και κατά συνέπεια της ευεργετικής επίδρασης τους επί των ομοιοστατικών μηχανισμών του ζώου.

Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2, δεν επηρέασε σημαντικά καμία από τις συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης και της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων, αποτέλεσμα το οποίο έρχεται σε συμφωνία με αυτά προηγούμενων μελετών στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη φυτοβιοτικών που περιείχαν μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη (Hosseinzadeh and Farhoomand, 2014; Petrovic et al., 2012; Toghyani et al., 2010). Παρόλα αυτά, η προσθήκη αιθέριου ελαίου με κύριο συστατικό την ανηθόλη έχει αναφερθεί ότι είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης (Hong et al., 2012) και της γλυκόζης (Soltan et al., 2008) στο πλάσμα του αίματος ορνιθίων. Οι προαναφερθείσες

αποκλίσεις των επιδράσεων της προσθήκης φυτοβιοτικών βασισμένων σε μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη επί βιοχημικών παραμέτρων στο πλάσμα του αίματος πιθανόν να μπορούν να εξηγηθούν από τα βιοενεργά συστατικά που αυτά αποτελούνται σε κάθε περίπτωση, από τα επίπεδα προσθήκης τους αλλά και από τη σύσταση του εκάστοτε σιτηρεσίου (Toghyani et al., 2010).

Η προσθήκη του ΦΣ2, δεν είχε σημαντική επίδραση επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας και πιο συγκεκριμένα στο μηρό και στο στήθος των ορνιθίων. Αντίθετα σε άλλες μελέτες η προσθήκη φυτοβιοτικών έχει αναφερθεί ότι προκάλεσε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας των ορνιθίων (Botsoglou et al., 2002; Goni et al., 2007). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι, ορισμένα συστατικά αιθέριων ελαίων μπορεί να απορροφούνται πολύ γρήγορα μετά από χορήγηση τους στην τροφή και/ή να εξουδετερώνονται στο ήπαρ χωρίς να γίνεται εναπόθεση τους στο σώμα των ορνιθίων (Lee et al., 2004). Επίσης, η προαναφερθείσα ιδιότητα των συστατικών των αιθέριων ελαίων μπορεί πιθανόν να εξηγήσει την απουσία επίδρασης των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας παρά την αύξηση της αντίστοιχης στο πλάσμα του αίματος.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων στο σπλήνα και στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου των ορνιθίων μιας παλέτας σημαντικών βιοδεικτών, γνωστών για τον προφλεγμονώδη (IL-18, iNOS, IL-2, IFN- γ) και αντιφλεγμονώδη (TGF- β 4, IL-10) ρόλο τους. Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση με γραμμικό τρόπο της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-18 στο σπλήνα. Η ιντερλευκίνη IL-18, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των προφλεγμονώδων κυτταροκινών της IL-1 και προέρχεται από τη διάσπαση πρόδρομης κυτταροκίνης προ-IL-18 από την κασπάση 1. Η προ-IL-18 παράγεται από τα μακροφάγα, τα χονδροκύτταρα και τους οστεοβλάστες ενώ ο υποδοχέας της IL-18 εντοπίζεται στα T-λεμφοκύτταρα, τα ώριμα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα τύπου 1 (T_H1), τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα χονδροκύτταρα (Βούλγαρη και Δρόσος., 2003). Η κυτταροκίνη IL-18 ακολουθώντας το δρόμο της IL-1 επιδρά διαμέσου του υποδοχέα της και των σημάτων ενεργοποιώντας μεταξύ άλλων την πρωτεΐνη πρωτογενούς απάντησης (MyD88) καθώς και τον μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B. Έχει προφλεγμονώδη δράση, ενισχύει την παραγωγή της ιντερφερόνης γ (IFN- γ) σε συνεργασία με την IL-12 στοχεύοντας T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της IFN- γ (Cox et al., 2010). Επιπρόσθετα, η IL-18 όπως προαναφέρθηκε ανήκει στην

οικογένεια προφλεγμονώδων κυτταροκίνων της IL-1 και είναι έτσι άμεσα εμπλεκόμενη με την φλεγμονώδη απόκριση και την έκκριση αντισωμάτων σε ζώα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση υπερθερμίας (Jang et al., 2014). Παρόλα αυτά, πέραν της επίδρασης των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 επί της γονιδιακής έκφρασης της IL-18 δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση σε κάποιον από τους υπόλοιπους εξεταζόμενους μοριακούς βιοδείκτες στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου γεγονός το οποίο πιθανόν να μπορεί να εξηγηθεί από την απουσία παθολογικού παράγοντα και από τις άριστες ζωοτεχνικές και κτηνιατρικές συνθήκες που ακολοθουθήκαν κατά την πραγματοποίηση του πειράματος.

Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, η ελάττωση της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-18 σε συστημικό επίπεδο είναι πιθανό να μπορεί ως ένδειξη να συνδεθεί την βελτιωμένη παραγωγική απόδοση των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε το ΦΣ2. Η προσθήκη φυτοβιοτικών έχει αναφερθεί ότι μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα και προφλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη δράση (Miguel, 2010; Tsai et al., 2011). Παρόλα αυτά, με παρόμοιο τρόπο με την παρούσα μελέτη, η προσθήκη ανηθόλης στο σιτηρέσιο ορνιθίων τα οποία δεν ήταν επιμολυσμένα με το παράσιτο *Eimeria acervulina*, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της γονιδιακής έκφρασης προφλεγμονώδων κυτταροκινών στο εντερικό σύστημα των ορνιθίων συγκριτικά με αυτή της επέμβασης στην οποία δεν χορηγήθηκε ανηθόλη (Kim et al., 2013).

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι η χορήγηση ενός μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) το οποίο αποτελείται από τα επιμέρους συστατικά της μενθόλης, της ανηθόλης και της ευγενόλης σε επίπεδα προσθήκης 100 και 150 mg / kg του σιτηρεσίου βελτίωσε την παραγωγική απόδοση, ενίσχυσε την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και προκάλεσε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη παρέχει αποδείξεις για τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις αλλά και για το ρόλο της χρησιμοποιηθέντος μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) ως φυσικού αυξητικού παράγοντα αλλά και για την ωφέλιμη επίδραση του επί της υγείας των ορνιθίων. Παρόλα αυτά, περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται έτσι ώστε να εκτιμηθούν οι επιδράσεις του ΦΣ2 επί των ανοσολογικών αποκρίσεων άλλα και των μεταβολών στη σύνθεση της εντερικής μικροβιακής μικροχλωρίδας σε συνδυασμό με διαφορετικούς τύπους σιτηρεσίων που αποτελεί το αντικείμενο της 5^{ης} μελέτη της παρούσας διατριβής.

Το μεγαλύτερο μέρος της 2^{ης} μελέτης περιέχεται στη δημοσίευση Paraskeuas et al., 2017a (Παράρτημα)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΜΕΛΕΤΗ 3

Τίτλος: Επίδραση των επιπέδων προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών βασισμένου σε μενθόλη και ανηθόλη επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, των βιοχημικών παραμέτρων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος και στο κρέας αλλά και της γονιδιακής έκφρασης μοριακών βιοδεικτών σχετιζόμενων με την ανοσοβιολογική απόκριση των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο σε σιτάρι.

6.1 Σκοπός

Ο στόχος της παρούσας μελέτης, ήταν η διερεύνηση και ο προσδιορισμός των επιδράσεων των επιπέδων (συγκεντρώσεων) προσθήκης (0, 100 και 150 mg / kg σιτηρεσίου) του ίδιου μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) με τη δεύτερη μελέτη το οποίο είχε ως κύρια βιοενεργά συστατικά την μενθόλη, την ανηθόλη και την ευγενόλη επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών της τροφής, βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος και στο κρέας, καθώς επίσης και επί της σχετικής γονιδιακής έκφρασης κυτταροκινών στο σπλήνα και στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου, ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε βασικό σιτηρέσιο με κυρίως χρησιμοποιούμενο δημητριακό καρπό το σιτάρι.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις

Ίδιος πειραματικός σχεδιασμός με αυτόν που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 5.2.1 με τη μόνη διαφορά πως όλοι οι τύποι των βασικών σιτηρεσίων (εναρκτήριο, ανάπτυξης και πάχυνσης) ήταν βασισμένοι σε σιτάρι-σογιάλευρο (**Πίνακας 6.1**). Επίσης, όπως και στο δεύτερο πείραμα εξαρτωμένης της προσθήκης ή μη ΦΣ2 στο βασικό σιτηρέσιο, προέκυψαν οι παρακάτω πειραματικές επεμβάσεις: ΦΣ2-0 (χωρίς προσθήκη ΦΣ2 στο βασικό σιτηρέσιο), ΦΣ2-100 (με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg/kg στο βασικό σιτηρέσιο) και ΦΣ2-150 (με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg/kg στο βασικό σιτηρέσιο). Σε αυτό το σημείο, πρέπει να σημειωθεί πως οι μελέτες 2 και 3 πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα με τις ίδιες συνθήκες εκτροφής στον ίδιο

πειραματικό χώρο, χρησιμοποιώντας ίδιο αριθμό (225) ορνιθίων κρεοπαραγωγής Cobb 500 ηλικίας μιας ημέρας η καθεμία, τα οποία αποκτήθηκαν από το ίδιο εκκολαπτήριο.

Πίνακας 6.1 Συστατικά (g/kg) και υπολογισμένη/προσδιορισμένη χημική σύσταση (g/kg σιτηρεσίου) του σιτηρεσίου.

Συστατικά	Σιτηρέσια βασισμένα σε σιτάρι		
	Εναρκτήριο (1-14 ^η ημέρα)	Ανάπτυξης (15-28 ^η ημέρα)	Πάχυνσης (29-42 ^η ημέρα)
Σιτάρι	586.9	598.1	621.9
Σογιάλευρο (460 ολικής πρωτεΐνης g/kg)	318.4	276.9	234.1
Πίτυρα	0.0	15.4	30.5
Σογιέλαιο	25.0	40.0	0.0
Φυτικό Λίπος ¹	25.7	26.4	73.5
Μαρμαρόσκονη	13.5	13.1	12.4
Φωσφορικό μονοασβέστιο	16.3	15.5	14.1
Αλάτι (NaCl)	4.8	4.1	3.9
L-λυσίνη	2.2	2.4	2.4
DL-μεθειονίνη	2.6	2.6	2.4
L-θρεονίνη	0.59	0.88	0.89
Πρόμικτα βιταμινών ²	2.0	2.0	2.0
Πρόμικτα ιχνοστοιχείων ³	2.0	2.0	2.0
Κοκκιδιοστατικό (<i>Monteban 100</i>)	0.60	0.60	0.0
Μίγμα Φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) ⁴	—	—	—
<i>Υπολογισμένη χημική σύσταση και ενέργεια</i>			
AME _N , (MJ/kg σιτηρεσίου)	12.50	12.9	13.15
Ξηρά ουσία (g/kg)	886.3	887.6	887.2
Ολική πρωτεΐνη (g/kg)	215.0	200.0	185.0
Λιπαρές ουσίες (g/kg)	64.0	80.0	87.5
Ινώδεις ουσίες (g/kg)	27.7	27.5	27.5
Λυσίνη (g/kg)	12.4	11.6	10.5
Μεθειονίνη-κυστεΐνη (g/kg)	9.2	8.9	8.2
Θρεονίνη (g/kg)	8.2	7.8	7.2
Ασβέστιο (g/kg)	10.0	9.6	9.0
Διαθέσιμος φώσφορος (g/kg)	5.0	4.8	4.5

Νάτριο (g/kg)	2.0	1.7	1.6
¹ Φυτικό λίπος προερχόμενο από επιλεκτικό διαχωρισμό φοινικέλαιου χωρίς χημική επεξεργασία σε σκόνη με 6% λεκιθίνη (BERGAFAT HTL-306, Berg & Schmidt, Hamburg, Germany)			
² Το πρόμιγμα βιταμινών για την εναρκτήρια και τη φάση ανάπτυξης (Rovimix 11 Bro Basic, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 3.6 mg ρετινόλης (Βιτ.Α), 100 µg χολοκαλσιφερόλη (Βιτ.Δ ₃), 80 mg Βιτ.Ε, 9 mg μεναδιόνης (Βιτ.Κ ₃), 3 mg θειαμίνη, 7 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 µg κυανοβαλαμίνη, 50 mg νικοτινικό οξύ, 15 mg παντοθενικό οξύ, 1.5 mg φυλλικό οξύ, 150 µg βιοτίνη. Το πρόμιγμα βιταμινών για τη φάση τελικής πάχυνσης (Rovimix 12 Bro Basic, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 3.6 mg ρετινόλης (Βιτ.Α), 75 µg χολοκαλσιφερόλη (Βιτ.Δ ₃), 50 mg Βιτ.Ε, 7 mg μεναδιόνης (Βιτ.Κ ₃), 3 mg θειαμίνη, 6 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 µg κυανοβαλαμίνη, 40 mg νικοτινικό οξύ, 12 mg παντοθενικό οξύ, 1.2 mg φολικό οξύ, 150 µg βιοτίνη.			
³ Το πρόμιγμα ανόργανων στοιχείων (Rovimix Bro M, DSM, Netherlands) παρείχε ανά kg σιτηρεσίου: 400 mg χλωριούχο χολίνη, 250 µg Co, 1.5 mg I, 300 µg Se, 50 mg Fe, 130 mg Mn, 20 mg Cu and 100 mg Zn.			
⁴ Το μίγμα φυτογενών συστατικών που χορηγήθηκε (Digestarom [®] Poultry, Biomin Phytogenics GmbH, Germany) προστέθηκε στο σιτηρέσιο σε συγκέντρωση 100 και 150 mg/kg σιτηρεσίου με φορέα αραβόσιτο αντίστοιχα στο σιτηρέσιο κάθε φάσης.			

6.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Βλ. κεφάλαιο 4.2.2.

6.2.3 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών

Βλ κεφάλαιο 5.2.3.

6.2.4 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος

Βλ. κεφάλαιο 4.2.4.

6.2.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (στήθος και μηρό) και συγκέντρωσης χοληστερόλης στο κρέας (μηρό).

Αναφορικά με τις αναλύσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας αυτές πραγματοποιήθηκαν όπως στο κεφάλαιο 4.2.5. Η συγκέντρωση χοληστερόλης στο κρέας (μηρό) προσδιορίστηκε με τη χρήση εμπορικού ενζυμικού kit αντιδραστηρίων (Biosis Ltd).

6.2.6 Απομόνωση RNA και PCR αντίστροφης μεταγραφής

Βλ. κεφάλαιο 5.2.6.

6.2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real-time PCR).

Βλ. κεφάλαιο 5.2.7 και πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2. Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR.

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχίες εκκινητών (5'-3') ^A	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Αριθμός πρόσβασης Genbank
GAPDH	F: GCTGAATGGGAAGCTTACTG R: AAGGTGGAGGAATGGCTG	60	216	NM_204305.1
IFN-γ	F: AGCTCCCGATGAACGAC R: CAGGAGGTCATAAGATGCCA	62	151	NM_205149.1
TGF-β4	F:GGACGGATGAGAAGAAGCTG R:ACGGACCACCATATTGGA	62	296	M31160.1
IL18	F:GTTGTTTCGATTTAGGGAAGGAG R:TCAAAGGCCAAGAACATTCC	60	146	NM_204608.1
IL10	F: GACCAGCACCAGTCATCAG R:CCGTTCTCATCCATCTTCTCG	62	159	EF554720.1
IL2	F:AGTCTTACGGGTCTAAATCACAC R:GGACAGCAGATTAGTTAGCCA	62	219	AF000631.1
iNOS	F:AAAGAAAGGGATCAAAGGTGGT R:CAAGCATCCTCTTCAAAGTCTG	60	296	NM_204961.1

^A F:Forward (αριστερός εκκινητής), R:Reverse (δεξιός εκκινητής)

6.2.8 Στατιστική ανάλυση

Βλ. κεφάλαιο 5.2.8.

6.3 Αποτελέσματα

6.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων 42 ημερών

Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 στην φάση πάχυνσης είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού γραμμικού μοτίβου αύξησης ($P=0.044$) του ΡΑΣΒ. Επιπρόσθετα, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2, είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό γραμμικό μοτίβο μείωσης ($P=0.035$) της ΚΤ και τετραγωνικό μοτίβο μείωσης ($P=0.024$) του ΣΕΤ συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, με την επέμβαση ΦΣ2-100 να εμφανίζει στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη ($P=0.042$) ΚΤ και ΣΕΤ ($P=0.048$), συγκριτικά με την επέμβαση ΦΣ2-0 στην οποία δεν πραγματοποιήθηκε χορήγηση ΦΣ2. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις της προσθήκης ΦΣ2 επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών στην εναρκτήρια φάση και στη φάση ανάπτυξης (Πίνακας 6.3).

Πίνακας 6.3. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της εναρκτήριας φάσης (1-14^η), της φάσης ανάπτυξης (15-28^η), της φάσης πάχυνσης (29-42^η) και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (1-42^η).

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹				Στατιστική Ανάλυση ⁴		
					ANOVA	Πολυωνυμικές Συγκρίσεις	
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150	SEM ³	P	P _{γραμμικό}	P _{τετραγωνικό}
1-14 ^η ημέρα							
ΡΑΣΒ	337.1	330.1	326.4	14.69	0.767	0.482	0.901
ΚΤ	466.9	451.6	445.0	19.35	0.527	0.280	0.797
ΣΕΤ	1.39	1.37	1.36	0.037	0.830	0.563	0.879
15-28 ^η ημέρα							
ΡΑΣΒ	945.0	907.9	888.6	49.10	0.524	0.273	0.837
ΚΤ	1513.3	1416.4	1453.5	53.16	0.225	0.283	0.171
ΣΕΤ	1.60	1.57	1.64	0.049	0.390	0.527	0.228
29-42 ^η ημέρα							
ΡΑΣΒ	1042.5	1091.8	1129.7	38.78	0.089	0.044	0.868
ΚΤ	2456.3	2265.9	2449.5	111.30	0.194	0.952	0.076
ΣΕΤ	2.36	2.07	2.17	0.107	0.058	0.104	0.063
1-42 ^η ημέρα							
ΡΑΣΒ	2324.6	2329.8	2344.7	66.40	0.952	0.767	0.935
ΚΤ	4436.5 ^b	4133.9 ^a	4348.0 ^{ab}	125.53	0.042	0.494	0.035
ΣΕΤ	1.91 ^b	1.78 ^a	1.86 ^{ab}	0.046	0.048	0.286	0.024

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με n=5 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) στην ίδια γραμμή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P<0.05).

³Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

6.3.2 Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και συντελεστής φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένος για το άζωτο (AME_N) ορνιθίων 42 ημερών.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της αύξησης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 επί κανενός από τους εξεταζόμενους συντελεστές φαινομένης πεπτικότητας (ΞΟ, ΟΠ και ΛΟ) και AME_N (Πίνακας 6.4).

Πίνακας 6.4. Ολική φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και συντελεστής φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένης για το άζωτο (AME_N).

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹				Στατιστική Ανάλυση		
					ANOVA	Πολυωνυμικές Συγκρίσεις ⁴	
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150	SEM ³	P	P _{γραμμικό}	P _{τετραγωνικό}
Ξηρά ουσία	70.5	70.5	68.4	1.10	0.057	0.085	0.287
Ολική πρωτεΐνη ⁵	76.1	73.4	71.3	4.41	0.657	0.382	0.855
Λιπαρές ουσίες	65.2	63.6	59.1	3.19	0.154	0.621	0.090
AME _N ⁶	12.2	12.5	12.4	0.43	0.801	0.664	0.621

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

²Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους των επεμβάσεων από n=4 κελιά πεπτικότητας ανά επέμβαση.

³Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

⁵Οι τιμές των συντελεστών ολικής φαινομένης πεπτικότητας για την ολική πρωτεΐνη διορθώθηκαν ως προς την περιεκτικότητα του ουρικού οξέος σε άζωτο.

⁶Φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια διορθωμένη για το άζωτο.

6.3.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και βιοχημικές παράμετροι στο πλάσμα του αίματος ορνιθίων 42 ημερών.

Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στατιστικά σημαντικού γραμμικού μοτίβου αύξησης ($P=0.001$) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων, με τις επεμβάσεις ΦΣ2-100 και ΦΣ2-150 να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές ($P = 0.003$) συγκριτικά με αυτές της επέμβασης ΦΣ2-0. Επιπρόσθετα, αναφορικά με τη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων παρουσίασε στατιστικά σημαντικό γραμμικό μοτίβο ελάττωσης ($P=0.005$) με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2, με τις επεμβάσεις ΦΣ2-100 και ΦΣ2-150 να παρουσιάζουν τις στατιστικά χαμηλότερες τιμές ($P=0.006$) συγκριτικά με αυτές της επέμβασης ΦΣ2-0 (Πίνακας 6.5).

Πίνακας 6.5. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, τριγλυκεριδίων και γλυκόζης στο πλάσμα αίματος ορνιθίων κρεοπαγωγής 42 ημερών.

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹			Στατιστική Ανάλυση ⁴			
				ANOVA	Πολυωνυμικές Συγκρίσεις		
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150	SEM ³	P	P _{γραμμικό}	P _{τετραγωνικό}
Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol TE/L)	10.14 ^a	13.46 ^b	14.99 ^b	1.281	0.003	0.001	0.425
Πρωτεΐνη (g/dL)	8.41	8.61	8.52	0.434	0.901	0.795	0.710
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	44.07 ^b	30.13 ^a	29.96 ^a	4.608	0.006	0.005	0.096
Γλυκόζη (mg/dL)	376.2	373.1	411.9	24.75	0.238	0.161	0.337

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους των επεμβάσεων από n=10 ορνίθια ανά επέμβαση. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες (a,b) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P<0.05).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

6.3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκέντρωση χοληστερόλης στο κρέας ορνιθίων 42 ημερών.

Οι τιμές της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας (μηρό, στήθος) δεν επηρεάστηκαν στατιστικά σημαντικά ($P>0.05$) από την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (**Πίνακας 6.6**). Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στο κρέας και πιο συγκεκριμένα στο μηρό των ορνιθίων παρουσίασε στατιστικά σημαντικό γραμμικό ($P=0.016$) μοτίβο μείωσης με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (**Πίνακας 6.6**).

Πίνακας 6.6. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκέντρωση χοληστερόλης στο κρέας

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹				Στατιστική Ανάλυση ⁴		
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150	SEM ³	ANOVA <i>P</i>	Πολυωνυμικές συγκρίσεις <i>P</i> _{γραμμικό}	<i>P</i> _{τετραγωνικό}
			<i>Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol TE/g)</i>				
Στήθος	40.07	34.82	39.12	3.968	0.383	0.812	0.176
Μηρός	33.22	30.62	33.27	2.980	0.601	0.989	0.318
			<i>Χοληστερόλη (mg/100 g)</i>				
Μηρός	190.4	169.2	149.6	15.89	0.052	0.016	0.953

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

²Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους των επεμβάσεων από n=10 ορνίθια ανά επέμβαση (2 από κάθε κελί).

³Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

6.3.5 Σχετική γονιδιακή έκφραση κυτταροκινών στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων

Η σχετική γονιδιακή έκφραση των προφλεγμονώδων IFN- γ , IL-18, IL-2, IL-12, iNOS και αντιφλεγμονώδων IL-10, TGF- β 4 βιοδεικτών προσδιορίστηκε στα δευτερογενή λεμφικά όργανα του σπλήνα και των λεμφαδένων του τυφλού εντέρου των ορνιθίων την 42^η ημέρα του πειράματος. Η σχετική γονιδιακή έκφραση των ιντερλευκίνων IL-10 και IL-12 στο σπλήνα και η IL-12 στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου, παρουσίασαν τιμές για το κατώφλι ανίχνευσης (cycle threshold) >30 και για αυτό το λόγο εξαιρέθηκαν από την παρακάτω στατιστική ανάλυση. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με τις σχετικές γονιδιακές εκφράσεις των TGF- β 4, IL-18, iNOS2, IL-2 και IFN- γ στο σπλήνα (**Πίνακας 6.7**). Από την άλλη πλευρά αναφορικά με τη σχετική γονιδιακή έκφραση των μοριακών βιοδεικτών που προσδιορίστηκε στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του στατιστικά σημαντικού τετραγωνικού μοτίβου μείωσης ($P = 0.046$) για την σχετική γονιδιακή έκφραση της IL-2. Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 δεν επηρέασαν στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$) την σχετική γονιδιακή έκφραση των TGF- β 4, IL-10, IL-18, iNOS2 και IFN- γ στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου των ορνιθίων (**Πίνακας 6.7**).

Πίνακας 6.7. Σχετική γονιδιακή έκφραση TGF-β4, IL-18, IL-10, iNOS, IL-2 and IFN-γ στο σπλήνα και στους λεμφικούς αδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών.

Δεδομένα ²	Επεμβάσεις ¹			Στατιστική ανάλυση ⁴			
				ANOVA		Πολυωνυμικές συγκρίσεις	
	ΦΣ2-0	ΦΣ2-100	ΦΣ2-150	SEM ³	P	P _{γραμμικό}	P _{τετραγωνικό}
Σπλήνας ⁵							
TGF-β4	1.34	1.74	0.93	0.471	0.262	0.394	0.162
IL-18	1.24	1.32	1.33	0.363	0.966	0.817	0.913
iNOS2	1.94	0.74	1.35	0.790	0.300	0.472	0.212
IL-2	1.28	1.52	1.07	0.605	0.755	0.732	0.514
IFN-γ	1.09	1.38	0.94	0.521	0.696	0.773	0.432
Λεμφαδένες Τυφλού Εντέρου ⁵							
TGF-β4	0.86	1.09	1.03	0.292	0.728	0.571	0.587
IL-18	0.94	1.77	0.97	0.552	0.272	0.966	0.114
iNOS2	1.12	1.09	0.90	0.487	0.883	0.648	0.860
IL-2	0.73	1.50	0.80	0.378	0.123	0.864	0.046
IL-10	0.90	1.60	0.99	0.524	0.381	0.869	0.176
IFN-γ	0.88	1.35	1.01	0.465	0.603	0.804	0.339

¹ ΦΣ2-0 (βασικό σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ΦΣ2), ΦΣ2-100 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου), ΦΣ2-150 (βασικό σιτηρέσιο με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2/kg σιτηρεσίου).

² Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τους μέσους κάθε επέμβασης με n=5 ορνίθια ανά επέμβαση.

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Η στατιστική ανάλυση προσδιόρισε τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (ANOVA) και το γραμμικό και πολυωνυμικό μοτίβο επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 (Πολυωνυμικές συγκρίσεις).

⁵ Ο υπολογισμός των τιμών των σχετικών εκφράσεων των γονιδίων στόχων πραγματοποιήθηκε βάση του Pfaffl et al. (2001) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς GAPDH.

6.4 Συζήτηση-Σχολιασμός

Στην παρούσα μελέτη, ο ΣΕΤ βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη ΦΣ2 παρουσιάζοντας τετραγωνικό μοτίβο ελάττωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 των 100 mg / kg και 150 mg / kg σιτηρεσίου παρουσίασαν 6.8% και 2.6% χαμηλότερο ΣΕΤ καθόλη τη διάρκεια του πειράματος συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές του ΣΕΤ για την επέμβαση ΦΣ2-0, αντίστοιχα. Η προσθήκη φυτοβιοτικών τα οποία περιέχουν μενθόλη και ανηθόλη, έχει αναφερθεί ότι δεν επηρεάζει το ΡΑΣΒ (Ocak et al., 2008; Amad et al., 2011; Erhan et al., 2012), προκαλεί ελάττωση της ΚΤ (Erhan et al., 2012) και βελτίωση του ΣΕΤ (Erhan et al., 2012; Hong et al., 2012). Παρόλα αυτά στη μελέτη των Lonkova et al. (2001) αναφέρεται ότι το φυτό της μέντας (*Mentha piperita* L) επιδρά ευεργετικά επί των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων, αναφορά η οποία επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των Galib and Al Kassie, (2010) στην οποία η χορήγηση αποξηραμένων φύλλων του φυτού είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του ΡΑΣΒ, μείωση της ΚΤ και βελτίωση του ΣΕΤ. Γενικά, για τα φυτοβιοτικά όπως έχει προαναφερθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια έχει παρατηρηθεί ότι στην πλειοψηφία των μελετών προκαλούν αύξηση του ΡΑΣΒ, σε μικρότερο αριθμό μελετών ελάττωση της ΚΤ και ως συνέπεια αυτών βελτίωση του ΣΕΤ. Παρόλα αυτά, σε άλλες μελέτες όπως αυτή των Brenes and Roura. (2010), αναφέρεται ότι οι βελτιώσεις του ΣΕΤ από την προσθήκη φυτογενών προϊόντων οφείλονται κυρίως στην ελάττωση της ΚΤ των ορνιθίων που αυτά προκαλούν ακόμα και όταν δεν μεταβάλλεται ο ΡΑΣΒ, με την ελάττωση αυτή να αποδίδεται στη δυσάρεστη τους γεύση που προκαλείται από την παρουσία των φαινολικών τερπενίων (Cross et al., 2003).

Η αποτελεσματικότητα της χορήγησης φυτοβιοτικών, είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από παράγοντες όπως τα βιοενεργά συστατικά των χρησιμοποιούμενων αιθέριων ελαίων και τα επίπεδα προσθήκης τους στο σιτηρέσιο καθώς επίσης η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου (Windisch et al., 2008; Mountzouris et al., 2009; Brenes and Roura, 2010). Σύμφωνα με την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση η επίδραση της προσθήκης φυτοβιοτικών με βασικά σιτηρέσια ορνιθίων με δημητριακό καρπό σιτάρι επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων έχει μελετηθεί μέχρι τώρα για το αιθέριο έλαιο θυμαριού (Cross et al., 2003), το αιθέριο έλαιο της ρίγανης

(Malayoglou *et al.*, 2010), μίγματα βιοενεργών συστατικών αιθέριων ελαίων όπως κινναμολδεύδης και θυμόλης (Amerah *et al.*, 2011) καθώς επίσης και καρβακρόλης και θυμόλης (Hashemipour *et al.*, 2016) αλλά όχι για την μενθόλη, την ανηθόλη και την ευγενόλη μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Βάση των παραπάνω, τα γραμμικά και τετραγωνικά μοτίβα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα μελέτη για τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, αποτελούν νέα δεδομένα και ενισχύουν το λόγο εκπόνησης του παρόντος πειράματος με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων προσθήκης του συγκεκριμένου μίγματος φυτογενών συστατικών το οποίο ήταν βασισμένο σε μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη σε συνδυασμό με χρήση βασικού σιτηρεσίου με δημητριακό καρπό το σιτάρι.

Η προσθήκη ενός μίγματος φυτογενών συστατικών, το οποίο είχε γλυκάνισο ως ένα από τα κύρια συστατικά του βελτίωσε την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Amad *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, η χορήγηση αιθέριων ελαίων μέντας σε σιτηρέσια ορνιθίων κρεοπαραγωγής, έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Hernandez *et al.*, 2004; Khodambashi Emami *et al.*, 2012). Επίσης, η προσθήκη του ΦΣ2 σε βασικό σιτηρέσιο με δημητριακό καρπό αραβόσιτο όπως είδαμε στη 2^η μελέτη της παρούσας διδακτορικής διατριβής, είχε ως αποτέλεσμα βελτίωση της πεπτικότητας της ξηράς ουσίας καθώς επίσης και της μεταβολιστέας ενέργειας διορθωμένης προς το άζωτο (AMEN). Παρόλα αυτά, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 στην παρούσα μελέτη στην οποία το βασικό σιτηρέσιο είχε ως δημητριακό καρπό σιτάρι, δεν επηρέασε την ολική πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών που εξετάστηκαν, γεγονός το οποίο επισημαίνει την μεγάλη σημασία της σύστασης του σιτηρεσίου επί της αποτελεσματικότητας της επίδραση των φυτοβιοτικών στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών στα ορνίθια. Το γεγονός επίσης της μη επίδρασης του ΦΣ2 επί των συντελεστών ολικής φαινομένης πεπτικότητας, δεν σημαίνει ότι αυτό συνεπάγεται και έλλειψη επιδράσεων επί της εντερικής μικροβιακής δραστηριότητας σε ειλεό και σε τυφλό έντερο η οποία ως γνωστό επηρεάζει και αυτή με τη σειρά της την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και η οποία θα μελετήθηκε στο 8^ο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά με τις επεμβάσεις ΦΣ2-100 και ΦΣ2-150 να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές κατά 24.7% και 32.4% συγκριτικά με αυτές της επέμβασης ΦΣ2-0 στην οποία

δε χορηγήθηκε το φυτογενές συστατικό του πειράματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία, με αυτά που αναφέρονται και σε άλλες μελέτες στις οποίες χορηγήθηκαν φυτοβιοτικά σε σιτηρέσια βασισμένα σε αραβόσιτο ή σιτάρι (Faix *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Ciftci *et al.*, 2010; Hoffman-Penesi *et al.*, 2010). Οι βελτιώσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος με την προσθήκη φυτοβιοτικών, δύναται να εξηγηθεί από τα βιοενεργά συστατικά και τις φαινολικές ομάδες τους που περιέχονται στο εκάστοτε χρησιμοποιούμενο φυτικό πρόσθετο (Polat *et al.*, 2011). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών των αρωματικών φυτών οφείλεται όπως έχει αναφερθεί, και στα προηγούμενα κεφάλαια κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες και στην χημική τους δομή (Brenes and Roura, 2010). Πιο συγκεκριμένα, ισχυρή αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων του φυτού *Mentha pullegium*, αναφέρεται στη μελέτη των Kamkar *et al.* (2010) ενώ η αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζει η ανηθόλη έχει αποδοθεί στη φαινυλοπροπυνοειδή της προέλευση και στο περιεχόμενο της σε φλαβονοειδή (Shojaii and Fard, 2012). Η σημαντική αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος που παρατηρήθηκε με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 το οποίο είχε ως βιοενεργά συστατικά κυρίως μενθόλη και ανηθόλη, στην παρούσα μελέτη, δείχνει ότι ο οργανισμός των πτηνών βρέθηκε σε υψηλό επίπεδο αντιοξειδωτικής κατάστασης και μάλιστα σε συστημικό επίπεδο καθώς αυτή εντοπίστηκε στο αίμα των πτηνών. Η τελευταία διαπίστωση έχει πολύ υψηλό επίπεδο σημαντικότητας καθώς δύναται να έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων, το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην ελάττωση του ρίσκου όπως έχουμε δει για εμφάνιση οξειδωτικού stress καθώς και την εμφάνιση των συσχετιζόμενων με αυτήν την κατάσταση ασθενειών στα πτηνά, όπως εκτεταμένες κυτταρικές βλάβες και κυτταρική νέκρωση (Hoffman-Pennesi *et al.*, 2010).

Η αξία των παραπάνω αποτελεσμάτων, αποκτά ακόμα μεγαλύτερη σημασία αν ληφθεί υπόψη η μελέτη των Fallah *et al.* (2013) στην οποία αναφέρεται ότι, τα αποτελέσματα της επίδρασης των αιθέριων ελαίων της μέντας επί παραγόντων σχετιζόμενων με το ανοσοποιητικό σύστημα, τις βιοχημικές παραμέτρους και την αντιοξειδωτική κατάσταση των ορνιθίων εμφανίζουν ανακολουθίες και περαιτέρω μελέτη για την κατανόηση τους και των μηχανισμών που τα διέπουν κρίνεται ως αναγκαία. Αναφορικά με την επίδραση της αύξησης των επιπέδων προσθήκης του

ΦΣ2 επί των εξεταζόμενων βιοχημικών παραμέτρων των ορνιθίων, στην παρούσα μελέτη, είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος με τις επεμβάσεις ΦΣ2-100 και ΦΣ2-150 να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές κατά 31.6% και 32% συγκριτικά με την επέμβαση ΦΣ2-0, αντίστοιχα. Γενικότερα, τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με αρκετές μελέτες στις οποίες έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση φυτοβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων (Lee et al., 2003; Zhang et al., 2009; Hajati et al., 2011), κυρίως όπως αναφέρεται λόγω της επίδρασης συγκεκριμένων συστατικών των αιθέριων ελαίων στην ελάττωση της αναγωγής του συνενζύμου 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA καθώς επίσης και της επίδρασης τους επί της λιπογένεσης (Lee et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα και σε σχέση με τη σύσταση του ΦΣ2 της παρούσας μελέτης, η προσθήκη αιθέριων ελαίων μέντας σε σιτηρέσια ορνιθίων είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων αλλά και της χοληστερόλης –η οποία δεν επηρεάστηκε στην παρούσα μελέτη από το ΦΣ2- στο πλάσμα του αίματος (Fallah et al., 2013). Παρόλα αυτά, στην μελέτη των Fallah et al. (2013)., αναφέρεται επίσης ότι, η ποικιλομορφία των αποτελεσμάτων η οποία παρατηρείται στις διάφορες μελέτες είναι πολύ πιθανόν σχετιζόμενη με τα επίπεδα προσθήκης των φυτοβιοτικών, την περιεκτικότητά τους σε βιοενεργά συστατικά αλλά ακόμα και στις συνθήκες διεξαγωγής του κάθε πειράματος.

Η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 δεν επηρέασε σημαντικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τη συγκέντρωση χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος, παρόλα αυτά η συγκέντρωση χοληστερόλης στο κρέας και πιο συγκεκριμένα στο μηρό των ορνιθίων παρουσίασε γραμμικό μοτίβο ελάττωσης, με την επέμβαση ΦΣ2-150 να παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές κατά 21.4% συγκριτικά με αυτές της επέμβασης ΦΣ2-0 στην οποία όπως είναι γνωστό δε χορηγήθηκε ΦΣ2. Γενικά ελάττωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο κρέας των ορνιθίων με προσθήκη φυτογενών προϊόντων έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία (Ponte et al., 2004; Salma et al., 2007; Ciftci et al., 2010). Οι ελαττώσεις αυτές πιθανόν να μπορούν να εξηγηθούν με παρόμοιο τρόπο με αυτό της ελάττωσης της συγκέντρωσης χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος, δηλαδή μέσω του παρεμποδιστικού ρόλου των φυτοβιοτικών στην ενεργότητα του ενζύμου της αναγωγής του HMG-CoA (Lee et al., 2004). Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη

το γραμμικό μοτίβο ελάττωσης της χοληστερόλης στο κρέας πιθανόν να μπορεί να συνδεθεί με το γραμμικό μοτίβο ελάττωσης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2. Πρέπει να σημειωθεί ότι, ανάλυση για τα επίπεδα χοληστερόλης πραγματοποιήθηκε μόνο στο μηρό των ορνιθίων και όχι στο στήθος καθώς αυτό είναι που παρουσιάζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος με άμεση συνέπεια σύμφωνα με τις προαναφερθείσες επιδράσεις των φυτοβιοτικών στην ελάττωση των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων να εμφανίζει και τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αποτελεσμάτων που να συνδέονται με αυτές.

Η προσθήκη του ΦΣ2, στην παρούσα μελέτη δεν παρουσίασε επίδραση επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας (μηρός και στήθος) των ορνιθίων. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των ορνιθίων αυξάνει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο κρέας (Botsoglou *et al.*, 2002; Goni *et al.*, 2007). Στην παρούσα μελέτη, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκε με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 χωρίς όμως όπως προαναφέρθηκε να έχουμε παρόμοια επίδραση επί της αντίστοιχης του κρέατος. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να μπορεί να εξηγηθεί με τα βιοενεργά συστατικά (μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη) και από τα επίπεδα προσθήκης τους στο σιτηρέσιο καθώς παρόμοια έλλειψη επίδρασης επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας και επίδραση επί της αντίστοιχης στο πλάσμα του αίματος παρουσιάστηκε για το ίδιο μίγμα φυτογενών συστατικών και στη 2^η μελέτη όπου σε εκείνη την περίπτωση στη θέση του σιταριού χρησιμοποιήθηκε ως δημητριακός καρπός ο αραβόσιτος, παράγοντας που όμως δε φαίνεται να επηρεάζει-η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου δηλαδή- την εξεταζόμενη παράμετρο την ολική αντιοξειδωτική ικανότητας. Επιπρόσθετα, αναφορά για σύνδεση της επίδρασης των φυτογενών προϊόντων επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας με παράγοντες όπως τα βιοενεργά συστατικά τους και τα επίπεδα προσθήκης των στο βασικό σιτηρέσιο έχει πραγματοποιηθεί και σε άλλες μελέτες (Botsoglou *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Επίσης, η έλλειψη επίδρασης του ΦΣ2 επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας είναι πιθανόν να μπορεί να συνδεθεί με την ιδιότητα ορισμένων συστατικών αιθέριων ελαίων να απορροφούνται πολύ γρήγορα ύστερα από χορήγηση τους μέσω της τροφής, να μεταβολίζονται και/ή να αδρανοποιούνται στο ήπαρ με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται εναπόθεση τους στο σώμα (Lee *et al.*, 2004). Είναι επίσης

σημαντικό να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με την καρβακρόλη, τη θυμόλη, το γ-τερπινένιο, το π-κυμένιο και την κινεόλη, η μενθόλη και η ανηθόλη δεν αναφέρονται ως ισχυρά αντιοξειδωτικά (Tipu *et al.*, 2006; Brenes and Roura, 2010).

Η ανηθόλη έχει αναφερθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες σε πολλά είδη θηλαστικών (Kim *et al.*, 2013). Παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη το ΦΣ2 δεν παρουσίασε επίδραση επί αντιφλεγμονώδων μοριακών βιοδεικτών όπως η ιντερλευκίνη IL-10 και ο παράγοντας TGF- β 4 στο σπλήνα και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα των ορνιθίων. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του 2^{ου} πειράματος, δηλαδή από την απουσία επιμόλυνσης με κάποιο παθολογικό παράγοντα των ορνιθίων καθώς επίσης και από τις άριστες ζωοτεχνικές και κτηνιατρικές συνθήκες που ακολοθουθήκαν κατά την πραγματοποίηση του πειράματος. Εκτός των αντιφλεγμονώδων μοριακών βιοδεικτών που προαναφέρθηκαν, στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε και η σχετική γονιδιακή έκφραση ορισμένων προφλεγμονώδων μοριακών βιοδεικτών όπως η ιντερφερόνη- γ (IFN- γ), οι ιντερλευκίνες IL-2 και IL-18 καθώς επίσης και η επαγόμενη συνθετάση του NO (iNOS). Η προσθήκη του ΦΣ2 δεν επηρέασε τη σχετική γονιδιακή έκφραση κανενός από τους μοριακούς βιοδείκτες στο σπλήνα, σε συστηματικό δηλαδή επίπεδο. Παρόλα αυτά, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 στο σιτηρέσιο, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τετραγωνικού μοτίβου αύξησης της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-2 στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου των ορνιθίων, με την επέμβαση ΦΣ-100 να παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές. Η IL-2 παράγεται κυρίως από τα CD4⁺ και από τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα, από τα δεύτερα όμως σε μικρότερες ποσότητες. Η μεταγραφή του γονιδίου της IL-2, η σύνθεση και η έκκριση της από τα T-λεμφοκύτταρα προάγεται 8-12 ώρες μετά την CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων από το αντιγόνο που την προκαλεί. Η IL-2 μεταξύ άλλων αποτελεί αυξητικό παράγοντα για τα λεμφοκύτταρα επάγοντας των πολλαπλασιασμό των ειδικών για το αντιγόνο T- και B-λεμφοκυττάρων καθώς επίσης διεγείρει τη σύνθεση άλλων προφλεγμονώδων κυτταροκινών όπως η IL-4, η IFN- γ (Kaiser *et al.*, 2006; Bayer *et al.*, 2007). Έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη ανηθόλης σε σιτηρέσια ορνιθίων ενισχύει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλώντας αύξηση προφλεγμονώδων κυτταροκινών όπως η IL-6 και η IL-8 (Kim *et al.*, 2013), αποτελέσματα τα οποία έρχονται σε συμφωνία με αυτά της αυξητικής επίδρασης της προσθήκης ΦΣ2 επί της προφλεγμονώδους IL-2 στην παρούσα μελέτη. Παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη,

όπως και στη δεύτερη μελέτη δεν παρατηρήθηκαν άλλες επιδράσεις της προσθήκης ΦΣ2 επί της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων στο σπλήνα και τους λεμφαδένες των τυφλών εντερών.

Συμπερασματικά, η προσθήκη ενός μίγματος φυτογενών συστατικών που περιείχε τη μενθόλη και την ανηθόλη ως βασικά βιοενεργά συστατικά του σε βασικά σιτηρέσια ορνιθίων με κύριο δημητριακό καρπό το σιτάρι, βελτίωσε την παραγωγική απόδοση των ορνιθίων στην τελική φάση πάχυνσης αλλά και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Η παρούσα μελέτη επίσης παρέχει νέα δεδομένα σχετικά με την ευεργετική επίδραση της μενθόλης και της ανηθόλης επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος αλλά όχι στο κρέας. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί η ταύτιση των αποτελεσμάτων αυτών με τη 2^η μελέτη στην οποία χορηγήθηκε το ίδιο μίγμα φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) σε βασικό σιτηρέσιο με κύριο δημητριακό καρπό τον αραβόσιτο και η συνολική αντίθεση των αποτελεσμάτων αυτών με αυτά της 1^{ης} μελέτης στην οποία χορηγήθηκε ένα φυτογενές συστατικό βασισμένο σε ρίγανη, γλυκάνισο και φλοιό εσπεριδοειδών σε βασικό σιτηρέσιο με κύριο δημητριακό καρπό αραβόσιτο και το οποίο άσκησε ισχυρή επίδραση και επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο κρέας. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια να μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η αντιοξειδωτική επίδραση των φυτοβιοτικών εξαρτάται άμεσα από τη σύσταση των βιοενεργών συστατικών και σε πολύ μικρότερο βαθμό από τον τύπο του βασικού σιτηρεσίου. Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη διαφάνηκε μια εξαρτώμενη από την αύξηση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2, ελάττωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος και της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο κρέας (μηρό) των ορνιθίων. Τέλος, παρά την αυξητική επίδραση της προσθήκης του ΦΣ2 επί της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-2 στους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία για τη μελέτη περισσότερων μοριακών βιοδεικτών σε δευτερογενή λεμφικά όργανα του εντερικού συστήματος για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων.

Το μεγαλύτερο μέρος της τρίτης μελέτης περιέχεται στη δημοσίευση:

Paraskeuas et al., 2017b (Παραρτημά).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΜΕΛΕΤΗ 4

Τίτλος: Επίδραση του σιτηρεσίου και της προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας και της έκφρασης μοριακών βιοδεικτών εντερικής υγείας και ακεραιότητας σε ορνίθια κρεοπαραγωγής.

7.1 Σκοπός

Στην πρώτη μελέτη παρουσιάστηκε ότι, η ελάττωση των επιπέδων (συγκεντρώσεων) ΜΕ και ΟΠ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, επηρέασε αρνητικά την παραγωγική απόδοση των ορνιθίων, ενώ η προσθήκη του ΦΣ1 παρουσίασε τάση να βελτιώσει την αρνητική αυτή επίδραση. Έτσι, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν μια πιο ολοκληρωμένη και σε βάθος διερεύνηση των παραπάνω συνεπειών της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1 μέσω του προσδιορισμού μοριακών και βιοχημικών παραμέτρων που σχετίζονται με τη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας, την εντερική υγεία και ακεραιότητα και την προφλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη απόκριση. Για την πραγματοποίηση του προαναφερθέντος σκοπού, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και στο εντερικό περιεχόμενο, η σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like, του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου στο εντερικό επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων. Τέλος, προσδιορίστηκε η σχετική γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων μοριακών βιοδεικτών στα δευτερογενή λεμφικά όργανα του σπλήνα και στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων.

7.2 Υλικά και μέθοδοι

7.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις

βλ. Κεφάλαιο 4.2.1

7.2.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Παρουσιάζονται για καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων του παρόντος πειράματος από την 1^η μελέτη μόνο οι συνολικές τιμές του ρυθμού αύξησης σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), της κατανάλωση τροφής (ΚΤ) και του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ) καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Για τα υπόλοιπα βλ. Κεφάλαιο 4.2.2.

7.2.3 Δειγματοληψία δειγμάτων για μοριακές αναλύσεις

Την 42^η ημέρα του πειράματος, 10 ορνίθια ανά επέμβαση (2 ορνίθια ανά επανάληψη, 2x5=10), επιλέχθηκαν τυχαία και πραγματοποιήθηκε σε αυτά με προσοχή σε πάγο και σε ασηπτικές συνθήκες, λήψη δειγμάτων ειλεού, τυφλών εντέρων, λεμφαδένων τυφλών εντέρων και σπλήνα τα οποία τοποθετήθηκαν άμεσα στο υγρό άζωτο και στη συνέχεια σε καταψύκτη σε θερμοκρασία -80⁰ C.

7.2.4 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων

Από την βαθιά κατάψυξη και τους -80⁰ C, στα δείγματα ειλεού και τυφλών εντέρων τα οποία ελήφθησαν από 5 ορνίθια ανά επέμβαση (1 ανά επανάληψη, 1x5=5) με τον τρόπο που αναλυτικά περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 7.2.3, σε ασηπτικές συνθήκες και σε πάγο πραγματοποιήθηκε τομή κατά μήκος στον ιστό με τη βοήθεια νυστεριού και με σπάτουλα πραγματοποιήθηκε λήψη εντερικού περιεχομένου το οποίο αποθηκεύτηκε σε αποστειρωμένα δοχεία όγκου 50 mL που με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια σε βαθιά κατάψυξη στους -80⁰ C. Μετά την απομάκρυνση του εντερικού περιεχομένου από τον ειλεό και τα τυφλά έντερα, στα τμήματα αυτά του εντέρου έγινε πλύση δύο φορές με ταυτόχρονη ανάδευση εντός αποστηρωμένων δοχείων όγκου 50 mL το οποίο περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Στη συνέχεια, σε κάθε ένα από τα τμήματα του

εντέρου του προηγούμενου βήματος πραγματοποιήθηκε εκ νέου τρεις φορές πλύση με ανάδευση διάρκειας ενός λεπτού σε αποστειρωμένα δοχεία των 50 mL τα οποία περιείχαν 15 mL παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων και 0.1% Tween 80. Το περιεχόμενο των 15 mL που προέκυψε μετά τις τρεις πλύσεις αναμείχθηκε και φυγοκεντρήθηκε σε 10.000xg στους 4⁰ C για 30 λεπτά. Το ίζημα κυττάρων εντερικού επιθηλίου του ειλεού και των τυφλών εντέρων που προέκυψε συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε άμεσα σε αποστειρωμένα παγωμένα δοχεία, μετά σε υγρό άζωτο και τέλος σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης στους -80⁰ C. Το συνολικό DNA απομονώθηκε από το εντερικό περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων καθώς επίσης και από το εντερικό επιθήλιο όπως αυτό προέκυψε από τις παραπάνω διεργασίες με τη βοήθεια εμπορικού kit αντιδραστηρίων για την απομόνωση του DNA (PSP[®] Spin Stool DNA Kit, Stratec Molecular GmbH, Berlin Germany). Το πρωτόκολλο της παραπάνω μεθόδου βελτιστοποιήθηκε με πρόσθετη προσθήκη λυσοζύμης σε συγκέντρωση 50 mg / mL στο βήμα της λύσης των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων στους 37⁰ C για 30 λεπτά. Το κάθε δείγμα, διαλύθηκε σε 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (elution buffer) ενώ η ποιότητα και η ποσότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού προσδιορίστηκε σπεκτροφωτομετρικά με τη βοήθεια μηχανήματος Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, UK) και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -30⁰ C.

Τα δείγματα του DNA, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των παρακάτω μικροβιακών συστατικών εντερικής μικροχλωρίδας: συνολικά βακτήρια, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* cluster I, *Clostridium* cluster IV και *Clostridium* cluster XIVa. Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές οι οποίοι στόχευαν το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA) για καθένα από τα μικροβιακά συστατικά στόχους και οι οποίοι ελήφθησαν από τις κατάλληλες πηγές στην βιβλιογραφία (**Πίνακας 7.1**). Η εξειδίκευση των εκκινητών πιστοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BLAST του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (NCBI). Τα κατάλληλα μικροβιακά στελέχη αναφοράς ύστερα από καλλιέργεια και απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση των εκκινητών και την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (**Πίνακας 7.1**).

Πίνακας 7.1. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές με στόχο το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA) που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των μικροβιακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και το εντερικό περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων με χρήση της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

Στόχος	Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (5' -3')	θ°C Ανόπτσης	Αναφορά
Συνολικά Βακτήρια	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	60	Clifford et al. 2012
<i>Escherichia coli</i>	F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA R: GGGTAACGTCAATGAGCAAAG G	60	Silkie et al. 2010
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTT C R: GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTC TTC	60	Delroisse et al. 2008
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F: CGCGTCYGGTGTGAAAG R: CCCCACATCCAGCATCCA	58	Peinado et al. 2013
<i>Bacteroides</i> spp.	F: GAGAGGAAGGTCCCCCAC R: CGCTACTTGGCTGGTTCAG	58	Peinado et al. 2013
<i>Clostridium</i> cluster I	F: TACCHRAGGAGGAAGCCAC R: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT	56	Borojeni et al. 2014
<i>Clostridium</i> cluster IV	F: GCACAAGCAGTGGAGT R: CTTCTCCGTTTTGTCAA	52	Matsuki et al. 2004
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	F: ACTCCTACGGGAGGCAGC R: CTTCTTAGTCAGGTACCGTCAT	60	Schwiertz et al. 2010

^A F:Forward (αριστερός εκκινητής), R:Reverse (δεξιός εκκινητής)

Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν βάση διαδοχικών αραιώσεων 1/10 (10-fold) γενωμικού DNA (gDNA) γνωστής συγκέντρωσης των μικροβιακών στελεχών αναφοράς που προέκυψαν από την καλλιέργεια και την απομόνωση DNA όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και σχεδιάστηκαν με βάση τις αντίστοιχες τιμές που παρουσίασε το εκάστοτε κατώφλι ανίχνευσης (threshold cycle). Στη συνέχεια, η ποσότητα μικροβιακού DNA (cfu) του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε και εκφράστηκε σε $\log_{10}$ κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχόμενου ή pellet κυττάρων εντερικού επιθηλίου, με υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων από το πηλίκο της ποσότητας του DNA διά τη μέση μάζα του αντίστοιχου μικροβιακού γενωμικού μεγέθους όπως αυτό ελήφθη από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (NCBI). Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε με το μηχάνημα ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, CA) με τη χρήση πλακών 96 κελιών (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μL που αποτελούνταν από 10 μL 2xGreen Dye Master Mix (Roalab GmbH, Teltow, Germany), δεξιούς (reverse) και αριστερούς (forward) ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 200 έως 300 Nμ (σε ποσότητα 0.4 ή 0.6 μL , από 10 μM stock), 1 μL αλβουμίνης βόειου ορού αίματος (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2 μL πρότυπου DNA δείγματος (50 ng δείγματος DNA/αντίδραση), 0.2 μL χρωστικής ROX (5 μM) σε 50 nM τελική συγκέντρωση και νερό κατάλληλο για PCR έως τον τελικό όγκο.

Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου – στόχου στους 95⁰ C για 10 λεπτά. Ακολούθησαν 40 κύκλοι των 95⁰ C για 30 δευτερόλεπτα, 52-60⁰ C (ανάλογη με το γονίδιο στόχο, βλ. **Πίνακα 7.1**) για 60 δευτερόλεπτα και 72⁰ C for 33 δευτερόλεπτα. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπυλών (melt curve analysis) ώστε να προσδιοριστεί η καθαρότητα των προϊόντων PCR που προέκυπταν από τις κορυφές των εξαγόμενων καμπυλών (**Πίνακας 7.1**). Κάθε δείγμα μετρήθηκε δύο φορές (duplicates).

7.2.5 Απομόνωση RNA και προσδιορισμός σχετικής έκφρασης γονιδίων στόχων σε επιθήλιο ειλεού και τυφλών εντέρων, λεμφαδένες τυφλού εντέρου και σπλήνα

Κατά την 42^η ημέρα του πειράματος, 5 ορνίθια ανά επέμβαση (1 από κάθε επανάληψη) επιλέχθηκαν τυχαία και οι λεμφαδένες τυφλού εντέρου καθώς επίσης και ο σπλήνας ελήφθησαν σε ασηπτικές συνθήκες ομογενοποιήθηκαν σε υγρό άζωτο και κατόπιν αποθηκεύτηκαν άμεσα στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω αναλύσεις. Επιπρόσθετα, στο μεσαίο τμήμα (15cm) του ειλεού και σε ολόκληρα τα τυφλά έντερα πραγματοποιήθηκε τομή κατά μήκος σε πάγο και σε ασηπτικές συνθήκες και όλη η ποσότητα του εντερικού περιεχομένου απομακρύνθηκε προσεκτικά. Στη συνέχεια στα τμήματα του εντέρου στα οποία απομακρύνθηκε το εντερικό περιεχόμενο πραγματοποιήθηκε πλύση 2 φορές με 25 mL παγωμένου διαλύματος PBS-EDTA ($\text{pH}=7.2$) και ελήφθη από αυτά με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας το στρώμα του βλεννογόνου της επιφάνειας το οποίο τοποθετήθηκε άμεσα σε αποστειρωμένο δοχείο όγκου 1 mL και απευθείας σε υγρό άζωτο. Ακολούθως, στους ομογενοποιημένους λεμφαδένες του τυφλού εντέρου και στο σπλήνα καθώς επίσης και στο επιθήλιο που ελήφθη από τον ειλεό και τα τυφλά έντερα πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trifast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η ποσότητα του RNA προσδιορίστηκε σπεκτροφωτομετρικά (NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United Kingdom). Πριν την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA από το RNA που απομονώθηκε, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του, με DNase. Πιο συγκεκριμένα 10 mg RNA αντέδρασαν με 1 U από DNase I (M0303, New England Biolabs Inc, Ipswich, UK) μαζί με 10 mL από ρυθμιστικό διάλυμα 10xDNase για 1 ώρα στους 37°C . Η απενεργοποίηση της DNase πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1 mL από 0.5 mol/L ethylene diamine tetraacetic acid στους 75°C για 10 λεπτά. Για τον έλεγχο της καθαρότητας του RNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης.

Για την σύνθεση του cDNA, σε 500 ng RNA από το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA με τη βοήθεια του kit αντιδραστηρίων PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Shiga-Ken, Japan) σύμφωνα πάντα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή (η αντίδραση έγινε στο μηχάνημα PCR

2400). Η ποσότητα cDNA για κάθε δείγμα που προέκυψε αποθηκεύθηκε στη συνέχεια στους -20°C .

Στο cDNA που ελήφθη από τα παραπάνω βήματα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των παρακάτω *Gallus gallus* γονιδίων (**Πίνακας 7.2**) Υποδοχείς Toll-like 2 και 4 (TLR2 και TLR4), κλαουδίνες 1 και 5 (CLDN1 και CLDN5), οκλουδίνη (OCLN), zonula οκλουδίνες 1 και 2, μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF- β 4), επαγόμενη συνθετάση του NO (iNOS), τις ιντερλευκίνες IL-18, IL-2, IL-10, IL-12, ιντερφερόνης γ (IFN- γ) και του γονιδίου αναφοράς glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Οι ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PerlPrimer program v.1.1.19 (Marshall, 2004) χρησιμοποιώντας αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών GenBank που είναι ελεύθερα διαθέσιμη και βρίσκεται υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α. και πιο συγκεκριμένα στο Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (NCBI) και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.2**. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να υβριδίζονται εντός της κωδικής περιοχής των μεταγραφόμενων γονιδίων. Επιπλέον, ο 1 από τους 2 εκκινητές επιλέχθηκε ώστε να υβριδίζεται και σε περιοχή ενδιάμεση εσωνίων και εξωνίων ώστε να εξασφαλιστεί η υβριδοποίηση ακόμα και στα πιο μικροσκοπικά τμήματα γενωμικού DNA. Στη συνέχεια οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου PRIMER BLAST σε σχέση με το γενωμικό υλικό του είδους *Gallus gallus* (όρνια) και των βάσεων δεδομένων mRNA έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπήρξε γενωμική επιμόλυνση και ότι υπήρξε γενωμικό υλικό μόνο από το συγκεκριμένο είδος ζώου. Επιπρόσθετα οι εκκινητές ελέγχθηκαν για την απόδοση της αντίδρασης (amplification efficiency), η οποία παρουσίασε διακύμανση με εύρος από 1.9 έως 2.0 για όλους τους εκκινητές ενώ τα αντίστοιχα R^2 (R squared, RSQ) παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροπλάκες 96 κελιών με τη βοήθεια του μηχανήματος Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) και με τη χρήση του KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA).

Κάθε αντίδραση περιείχε 12.5 ng RNA ισοδύναμων καθώς επίσης και 200 με 250 nmol/L αριστερού (forward) και δεξιού (reverse) εκκινητή για κάθε γονίδιο. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου – στόχου

στους 95⁰ C για 3 λεπτά. Ακολούθησαν 40 κύκλοι των 95⁰ C για 5 δευτερόλεπτα, 59 έως 65⁰ C ανάλογα με το γονίδιο στόχο (βλ. **Πίνακα 7.2**) για 20 δευτερόλεπτα και 72⁰ C for 33 δευτερόλεπτα. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπυλών (melt curve analysis) ώστε να προσδιοριστεί η καθαρότητα των προϊόντων PCR που προέκυπταν από τις κορυφές των εξαγόμενων καμπυλών. Κάθε δείγμα μετρήθηκε δύο φορές (duplicates). Οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων στόχων υπολογίστηκαν βάση της μελέτης του Pfaffl (2001) χρησιμοποιώντας το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς.

7.2.6 Στατιστική ανάλυση

βλ. Κεφάλαιο 4.2.6.

Πίνακας 7.2. Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR.

Γονίδιο-Στόχος	Αλληλουχία εκκινήτη (5'-3') ¹¹	θ ⁰ C ανόπτησης	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Αναφορά αλληλουχίας στο NCBI
GAPDH ¹	F:GCTGAATGGGAAGCTTACTG R: AAGGTGGAGGAATGGCTG	60	216	NM_204305.1
IFN-γ ²	F: AGCTCCCGATGAACGAC R:CAGGAGGTCATAAGATGCCA	62	151	NM_205149.1
TGF-β ³	F: GGACGGATGAGAAGAAGCTG R: ACGGACCACCATATTGGA	62	296	M31160.1
IL-2 ⁴	F:AGTCTTACGGGTCTAAATCACAC R: GGACAGCAGATTAGTTAGCCA	62	219	AF000631.1
IL-10 ⁴	F: GACCAGCACCAGTCATCAG R: CCGTTCTCATCCATCTTCTCG	62	159	EF554720.1
IL-12 ⁴	F:TCAGAGATATCATAAAGCCAGACC R: CCAGGATGAGTTGTAATAGCGA	62	256	DQ202328.1
IL-18 ⁴	F:GTTGTTTCGATTTAGGGAAGGAG R: TCAAAGGCCAAGAACATTCC	60	146	NM_204608.1
iNOS ⁵	F:AAAGAAAGGGATCAAAGGTGGT R: CAAGCATCCTCTTCAAAGTCTG	60	296	NM_204961.1
ZO1 ⁶	F:TAAAGCCATTCTGTAAAGCC R: GTTTCACCTTTCTCTTTGTCC	60	243	<u>XM_015278981.1</u>
ZO2	F: GGCAAATCATTGAGCAGGA R: ATTGATGGTGGCTGTAAAGAG	60	239	<u>XM_015280247.1</u>
CLDN1 ⁷	F: CTGATTGCTTCCAACCAG R: CAGGTCAAACAGAGGTACAAG	59	140	<u>NM_001013611.2</u>

CLDN5	F:CATCACTTCTCCTTCGTCAGC R:GCACAAAGATCTCCCAGGTC	59	111	NM_204201.1
OCLN ⁸	F:TCATCGCCTCCATCGTCTAC R:TCTTACTGCGCGTCTTCTGG	62	240	NM_205128.1
TLR2 ⁹	F:CTTGGAGATCAGAGTTTGGA R:ATTTGGGAATTTGAGTGCTG	62	238	XM_015301380.1
TLR4	F:GTCTCTCCTTCCTTACCTGCTGTTC R:AGGAGGAGAAAGACAGGGTAGGTG	65	187	NM_001030693.1
NF-κB ¹⁰	F:TGTGGTTGTCAGGATGGTC R:GGTCTGGTAAAGGTCATTTCTC	62	273	XM_015285418.1

¹ GAPDH = γονίδιο αναφοράς glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

² IFN-γ = ιντερφερόνη γ

³ TGF-β4 = αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β4

⁴ IL-2, 10, 12, 18 = Ιντερλευκίνες 2, 10, 12, 18

⁵ iNOS = επαγόμενη συνθετάση του NO (iNOS)

⁶ ZO1,2 = zona οκλουδίνες 1,2

⁷ CLDN1,5 = κλαουδίνες 1,5

⁸ OCLN = οκλουδίνη

⁹ NF-κB = μεταγραφικός παράγοντας NF-κB

¹⁰ TLR2,4 = υποδοχείς Toll-like 2,4

¹¹ F:Forward (αριστερός εκκινητής), R:Reverse (δεξιός εκκινητής)

7.3 Αποτελέσματα

7.3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α εμφάνισαν στατιστικά χαμηλότερες τιμές ($P_{TS}=0.010$) συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ) συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C, συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (42 ημέρες). Επιπρόσθετα, η προσθήκη ΦΣ1 παρουσίασε τάση βελτίωσης ($P_{\Phi\Sigma1}=0.089$) του ΣΕΤ συνολικά για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αντίθετα, ο τύπος του σιτηρεσίου και η προσθήκη ΦΣ1 δεν επηρέασαν σημαντικά ($P>0.05$) το συνολικό ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ) και την κατανάλωση της τροφής (ΚΤ) καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (**Πίνακας 7.3**).

Πίνακας 7.3. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων συνολικά για όλη (1-42^η) τη διάρκεια της πρώτης μελέτης (Κεφάλαιο 4)

Δεδομένα	Τύπος σιτηρεσίου ¹			Προσθήκη ΦΣ1 ²			P-values		
	A	B	C	0 mg/kg	125 mg/kg	SEM ³	ΤΣ ¹	ΦΣ1 ²	ΤΣxΦΣ1
Παράμετροι (1-42 ^η ημέρα)									
ΡΑΣΒ (g/ορνίθιο)	2447.2	2431.9	2383.6	2410.4	2431.4	45.16	0.355	0.575	0.514
ΚΤ (g/ορνίθιο)	4080.2	4175.1	4150.3	4156.4	4114.1	61.25	0.293	0.406	0.294
ΣΕΤ (g ΚΤ/g ΡΑΣΒ)	1.68 ^b	1.72 ^{ab}	1.74 ^a	1.73	1.69	0.023	0.010	0.089	0.955

¹ Τύπος σιτηρεσίου (Α, Β και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου Α είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου Β και C υπολείπονται του Α σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου (ΤΣ) αντιπροσωπεύουν μέσους από n=10 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 5 από Α+ 5 από ΑΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη (Α, Β) για τον τύπο σιτηρεσίου διαφέρουν σημαντικά (P<0.05).

² Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ1) αντιπροσωπεύουν μέσους από n=15 επαναλήψεις (πχ. 5 από ΑΦΣ1 + 5 από ΒΦΣ1+ 5 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές διαφορετικό εκθέτη (a,b) για την προσθήκη ΦΣ1 διαφέρουν σημαντικά (P<0.05).

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

7.3.2 Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών στον ειλεό και στα τυφλά έντερα

Σημαντικές αλληλεπιδράσεις σημειώθηκαν μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1 για τα συνολικά βακτήρια ($P_{T\Sigma \times \Phi\Sigma 1}=0.001$) και τους *Lactobacillus* spp. ($P_{T\Sigma \times \Phi\Sigma 1}=0.015$) στο επιθήλιο του ειλεού. Επιπρόσθετα, στο επιθήλιο του ειλεού τα επίπεδα των συνολικών βακτηρίων ($P_{T\Sigma}=0.005$) καθώς επίσης των *Lactobacillus* spp. ($P_{T\Sigma}=0.003$) και των *Clostridium* cluster XIVa ($P_{T\Sigma}=0.009$) επηρεάστηκαν σημαντικά από τον τύπο σιτηρεσίου. Πιο συγκεκριμένα τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου B εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα πληθυσμών συγκριτικά με αυτά των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου A και C (Πίνακας 7.4). Αντίθετα, στο επιθήλιο του ειλεού οι πληθυσμοί των συνολικών βακτηρίων, των *Lactobacillus* spp. και των *Clostridium* cluster XIVa δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P>0.05$) από την προσθήκη ΦΣ1. Αναφορικά με τους βακτηριακούς πληθυσμούς στο επιθήλιο του τυφλού εντέρου, οι πληθυσμοί των *Lactobacillus* spp. επηρεάστηκαν σημαντικά από τον τύπο του σιτηρεσίου ($P_{T\Sigma}=0.002$) με τα χαμηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου A και B. Αναφορικά με την προσθήκη ΦΣ και την επίδραση τους στη σύνθεση των βακτηριακών πληθυσμών στο επιθήλιο του τυφλού εντέρου, υψηλότερα επίπεδα πληθυσμών *Bacteroides* spp ($P_{\Phi\Sigma 1}=0.031$), *Clostridium* cluster IV ($P_{\Phi\Sigma 1}=0.007$) και *Clostridium* cluster XIVa ($P_{\Phi\Sigma 1}=0.039$) παρατηρήθηκαν όταν στο σιτηρέσιο των ορνιθίων χορηγήθηκε το μίγμα φυτογενών συστατικών του πειράματος.

Πίνακας 7.4. Επίπεδα βακτηριακών πληθυσμών στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια 42 ημερών.

	Τύπος Σιτηρεσίου ²			Προσθήκη ΦΣ1 ³			<i>P-values</i>		
	A	B	C	0 mg/kg	125 mg/kg	SEM ⁴	ΤΣ ²	ΦΣ1 ³	ΤΣxΦΣ1
Βακτήρια επιθηλίου (log ₁₀ cells/g pellet κυττάρων επιθηλίου) ¹									
Ειλεός									
Συνολικά βακτήρια	7.75 ^a	7.43 ^b	7.93 ^a	7.79	7.62	0.136	0.005	0.145	0.001
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.72 ^a	6.83 ^b	7.71 ^a	7.42	7.43	0.265	0.003	0.968	0.015
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	5.13 ^a	4.67 ^b	5.52 ^a	5.24	4.98	0.251	0.009	0.219	0.812
Τυφλά έντερα									
Συνολικά βακτήρια	8.69	8.84	8.55	8.60	8.79	0.130	0.097	0.088	0.778
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.95 ^a	6.83 ^a	6.26 ^b	6.53	6.82	0.185	0.002	0.063	0.758
<i>Bacteroides</i> spp.	4.53	4.44	4.41	4.23 ^B	4.69 ^A	0.246	0.866	0.031	0.133
<i>Clostridium</i> cluster IV	8.51	8.61	8.44	8.32 ^B	8.72 ^A	0.171	0.631	0.007	0.780
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	8.61	8.71	8.50	8.45 ^B	8.76 ^A	0.173	0.505	0.039	0.928

¹Η ποσότητα μικροβιακού DNA (cfu) κάθε δείγματος εκφράστηκε σε log₁₀ κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου ή pellet κυττάρων εντερικού επιθηλίου

² Τύπος σιτηρεσίου (A, B και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου A είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου B και C υπολείπονται του A σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου (ΤΣ) αντιπροσωπεύουν μέσους από n=10 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 5 από A+ 5 από ΑΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη (A, B) για τον τύπο σιτηρεσίου διαφέρουν σημαντικά (P<0.05).

³Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ1) αντιπροσωπεύουν μέσους από n=15 επαναλήψεις (πχ. 5 από ΑΦΣ1 + 5 από ΒΦΣ1+ 5 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές διαφορετικό εκθέτη (a,b) για την προσθήκη ΦΣ1 διαφέρουν σημαντικά (P<0.05).

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

Στο εντερικό περιεχόμενο του ειλεού, τα επίπεδα των πληθυσμών των *Lactobacillus* spp. level επηρεάστηκαν σημαντικά από τον τύπο σιτηρεσίου ($P_{TS}=0.012$) με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Β να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με αυτές στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α και C (Πίνακας 7.5). Αντίθετα, τα επίπεδα πληθυσμών στο ειλεακό εντερικό περιεχόμενο των συνολικών βακτηρίων, των *Clostridium* cluster XIVa, των *Bacteroides* spp. και των *Escherichia coli* δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P>0.05$) ούτε από τον τύπο σιτηρεσίου ούτε από την προσθήκη ΦΣ1. Σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τύπου του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1 παρατηρήθηκαν στο εντερικό περιεχόμενο των τυφλών εντέρων για τα επίπεδα των πληθυσμών των *Bifidobacterium* spp. ($P_{TS \times \Phi\Sigma 1}=0.011$), *Clostridium* cluster IV ($P_{TS \times \Phi\Sigma 1}=0.013$) και *Clostridium* cluster XIVa ($P_{TS \times \Phi\Sigma 1}=0.015$). Αντίθετα, οι πληθυσμοί των συνολικών βακτηρίων συνολικά βακτήρια, των *Escherichia coli*, των *Lactobacillus* spp., των *Bacteroides* spp., των *Clostridium* cluster IV και των *Clostridium* cluster XIVa στο εντερικό περιεχόμενο των τυφλών εντέρων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P>0.05$) ούτε από τον τύπο σιτηρεσίου ούτε από την προσθήκη ΦΣ1 (Πίνακας 7.5).

Πίνακας 7.5. Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών εντερικού περιεχομένου ειλεού και τυφλών εντέρων ορνιθίων 42 ημερών.

Δεδομένα (log ₁₀ κυττάρων/g εντερικού περιεχομένου) ¹	Τύπος Σιτηρεσίου ²			Προσθήκη ΦΣ1 ³			P-values		
	A	B	C	0 mg/kg	125 mg/kg	SEM ⁴	ΤΣ ²	ΦΣ1 ³	ΤΣxΦΣ1
Ειλεός									
Συνολικά βακτήρια	8.83	8.77	8.70	8.70	8.84	0.144	0.682	0.240	0.758
<i>Escherichia coli</i>	5.09	5.31	4.77	4.91	5.20	0.307	0.232	0.259	0.356
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.44 ^a	6.59 ^b	7.30 ^a	6.96	7.26	0.280	0.012	0.203	0.263
<i>Bacteroides</i> spp.	4.71	4.83	4.52	4.63	4.75	0.203	0.313	0.492	0.144
<i>Clostridial</i> cluster XIVa	7.85	7.88	7.82	7.90	7.79	0.147	0.923	0.363	0.601
Τυφλά έντερα									
Συνολικά βακτήρια	9.99	10.03	10.10	10.05	10.03	0.065	0.270	0.595	0.084
<i>Escherichia coli</i>	8.42	8.46	8.18	8.31	8.41	0.228	0.431	0.598	0.918
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.35	8.22	7.99	8.12	8.26	0.218	0.278	0.419	0.743
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6.94	6.79	6.74	6.91	6.73	0.107	0.164	0.065	0.011
<i>Bacteroides</i> spp.	5.28	5.00	4.89	4.99	5.12	0.311	0.446	0.605	0.768
<i>Clostridium</i> cluster I	7.95	8.06	7.95	8.02	7.96	0.153	0.690	0.635	0.209
<i>Clostridium</i> cluster IV	9.50	9.37	9.46	9.57	9.32	0.154	0.713	0.061	0.013
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	9.71	9.76	9.76	9.76	9.73	0.065	0.683	0.621	0.015

¹Η ποσότητα μικροβιακού DNA (cfu) κάθε δείγματος εκφράστηκε σε log₁₀ κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου ή pellet κυττάρων εντερικού επιθηλίου

² Τύπος σιτηρεσίου (Α, Β και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου Α είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου Β και C υπολείπονται του Α σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου (ΤΣ) αντιπροσωπεύουν τιμές από n=10 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 5 από Α+ 5 από ΑΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη (Α, Β) για τον τύπο σιτηρεσίου διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ1) αντιπροσωπεύουν μέσους από n=15 επαναλήψεις (πχ. 5 από ΑΦΣ1 + 5 από ΒΦΣ1+ 5 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές διαφορετικό εκθέτη (a,b) για την προσθήκη ΦΣ1 διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

7.3.3 Σχετική γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, των υποδοχέων Toll-like και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στο εντερικό επιθήλιο του ειλεού και τυφλών εντέρων.

Η γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου ZO1, CLDN1, CLDN5 και OCLN καθώς επίσης και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στο επιθήλιο του ειλεού των ορνιθίων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P>0.05$) ούτε από τον τύπο σιτηρεσίου ούτε από την προσθήκη ΦΣ1 (Πίνακας Δ6). Αντίθετα, η σχετική γονιδιακή έκφραση της ZO2 παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση ($P_{\Phi\Sigma1}=0.031$), ενώ η αντίστοιχη έκφραση του υποδοχέα TLR2 σημαντική μείωση ($P_{\Phi\Sigma1}=0.021$) με την προσθήκη ΦΣ1 στο επιθήλιο του ειλεού (Πίνακας 7.6). Στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων τα επίπεδα έκφρασης των ZO2 ($P_{\Phi\Sigma1}=0.009$), CLDN5 ($P_{\Phi\Sigma1}=0.005$) και OCLN ($P_{\Phi\Sigma1}=0.039$) παρουσιάστηκαν σημαντικά αυξημένα ύστερα από προσθήκη ΦΣ1. Επιπρόσθετα, παρόμοια με τα αποτελέσματα στο επιθήλιο του ειλεού, η γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα TLR2 στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων παρουσιάστηκε σημαντικά ελαττωμένη ($P_{\Phi\Sigma1}<0.001$) με την προσθήκη ΦΣ1. Ο τύπος του σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά ($P<0.05$) τα επίπεδα έκφρασης της CLDN5 ($P_{T\Sigma}=0.027$) στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C. Επιπρόσθετα, ο τύπος του σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά ($P<0.05$) τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα TLR2 ($P_{T\Sigma}=0.046$) στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α. Τέλος, ο τύπος σιτηρεσίου και η προσθήκη ΦΣ1 δεν παρουσίασαν σημαντική επίδραση ($P>0.05$) επί των επιπέδων έκφρασης των ZO1 και CLDN1, TLR4 και NF-κΒ στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων (Πίνακας 7.6).

Πίνακας 7.6. Σχετική γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (ZO1, ZO2, CLDN1, CLDN5, OCLN), των υποδοχέων Toll-like (TLR2, TLR4) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια 42 ημερών.

Επιθήλιο	Gene ¹	Τύπος Σιτηρεσίου ²			Προσθήκη ΦΣ1 ³			P-values		
		A	B	C	0 mg/kg	125 mg/kg	SEM ⁴	ΤΣ ²	ΦΣ1 ³	ΤΣ×ΦΣ1
Ειλεός	ZO-1	1.54	0.99	1.72	1.17	1.66	0.451	0.264	0.195	0.056
	ZO-2	1.24	1.88	1.08	1.02 ^B	1.77 ^A	0.398	0.127	0.031	0.099
	CLDN1	1.54	0.96	1.12	1.19	1.21	0.501	0.501	0.956	0.119
	CLDN5	0.94	1.42	1.42	1.27	1.25	0.516	0.570	0.975	0.254
	OCLN	0.97	1.21	1.19	0.97	1.28	0.381	0.628	0.184	0.009
	TLR-2	1.97	1.62	1.68	2.50 ^A	1.01 ^B	0.742	0.883	0.021	0.396
	TLR-4	1.13	1.97	1.41	2.01	0.99	0.688	0.474	0.083	0.327
	NF-κB	1.30	1.17	1.06	1.01	1.35	0.271	0.824	0.287	0.941
Τυφλά έντερα	ZO-1	1.07	1.04	1.07	0.90	1.22	0.250	0.989	0.136	0.146
	ZO-2	1.30	1.20	1.16	0.78 ^B	1.66 ^A	0.384	0.935	0.009	0.636
	CLDN1	1.18	0.86	1.57	0.82	1.59	0.464	0.322	0.054	0.222
	CLDN5	0.85 ^b	0.96 ^b	1.54 ^a	0.79 ^B	1.44 ^A	0.255	0.027	0.005	0.138
	OCLN	0.86	0.90	1.02	0.83 ^B	1.61 ^A	0.438	0.144	0.039	0.029
	TLR2	1.66 ^a	1.22 ^{ab}	0.76 ^b	1.81 ^A	0.62 ^B	0.337	0.046	<0.001	0.334
	TLR4	1.10	1.10	0.84	1.06	0.96	0.244	0.477	0.620	0.103
	NF-κB	1.29	1.31	0.77	1.21	1.04	0.268	0.095	0.459	0.036

¹ Η σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων στόχων υπολογίστηκε βάση της μελέτης του Pfaffl et al. (2001) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH.

² Τύπος σιτηρεσίου (Α, Β και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου Α είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου Β και C υπολείπονται του Α σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου (ΤΣ) αντιπροσωπεύουν τιμές από n=10 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 5 από Α+ 5 από ΑΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές με διαφορετικό εκθέτη (Α, Β) για τον τύπο σιτηρεσίου διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ1) αντιπροσωπεύουν τιμές από n=15 επαναλήψεις (πχ. 5 από ΑΦΣ1 + 5 από ΒΦΣ1+ 5 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές διαφορετικό εκθέτη (a,b) για την προσθήκη ΦΣ1 διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

7.3.4 Σχετική γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών στο σπλήνα και στα τυφλά έντερα

Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκε η γονιδιακή έκφραση των IFN- γ , TGF- β 4, IL-2, IL-10, IL-12, IL-18 και iNOS στο σπλήνα και στα τυφλά έντερα ορνιθίων 42 ημερών (**Πίνακας 7.7**). Η σχετική γονιδιακή έκφραση της IL-10 στο σπλήνα ήταν χαμηλή παρουσιάζοντας τιμές για το κατώφλι ανίχνευσης (threshold cycle) υψηλότερες από 30 κύκλους για αυτό και έτσι εξαιρέθηκε από την στατιστική ανάλυση. Σημαντική αλληλεπίδραση ($P_{T\Sigma \times \Phi\Sigma I}=0.011$) μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης $\Phi\Sigma I$ παρουσιάστηκε για την έκφραση της IL-2 στο σπλήνα. Παρόλα αυτά, καμία άλλη σημαντική ($P>0.05$) επίδραση των δύο εξεταζόμενων παραγόντων επί της έκφρασης των IFN- γ , TGF- β 4, IL-12, IL-18 και iNOS δεν παρατηρήθηκε στο (**Πίνακας 7.7**). Αναφορικά με τους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων, η έκφραση του TGF- β 4 επηρεάστηκε από τον τύπο του σιτηρεσίου σημαντικά ($P_{T\Sigma}=0.023$) με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου B συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφραση του προαναφερθέντος γονιδίου στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων των ορνιθίων στα οποία χορηγήθηκαν σιτηρέσια τύπου A και C, αντίστοιχα. Τέλος, η προσθήκη $\Phi\Sigma I$ δεν επηρέασε την έκφραση IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-18 και iNOS, στα τυφλά έντερα των ορνιθίων (**Πίνακας 7.7**).

Πίνακας 7.7. Σχετική γονιδιακή έκφραση TGF-β4, IL-18, IL-10, iNOS, IL-2 and IFN-γ στο σπλήνα και στους λεμφικούς αδένες του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών.

Ιστός	Τύπος Σιτηρεσίου ²				Προσθήκη ΦΣ1 ³			P-values ⁴		
	Γονίδιο ¹	A	B	C	0 mg/kg	125 mg/kg	SEM ⁴	ΤΣ ²	ΦΣ1 ³	ΤΣ×ΦΣ1
Σπλήνας										
	IFN-γ	1.04	1.19	0.83	0.96	1.08	0.223	0.302	0.512	0.993
	TGF-β4	1.01	1.08	0.96	1.03	1.00	0.113	0.561	0.765	0.425
	IL-2	1.00	1.15	0.90	1.02	1.01	0.144	0.233	0.929	0.011
	IL-12	0.98	0.97	1.39	0.88	1.35	0.395	0.476	0.156	0.688
	IL-18	1.06	1.10	0.92	1.07	0.98	0.262	0.767	0.702	0.717
	iNOS	1.33	0.90	0.92	0.95	1.15	0.402	0.480	0.540	0.982
Λεμφαδένες τυφλών εντέρων										
	IFN-γ	1.31	1.10	1.03	1.29	0.99	0.293	0.612	0.231	0.794
	TGF-β4	1.34 ^a	0.79 ^b	1.19 ^a	1.01	1.20	0.190	0.023	0.246	0.161
	IL-2	0.88	0.86	1.52	1.09	1.08	0.385	0.177	0.972	0.801
	IL-10	1.64	0.88	1.01	1.42	0.93	0.338	0.072	0.091	0.734
	IL-18	1.33	0.89	1.24	1.37	0.93	0.374	0.470	0.159	0.523
	iNOS	1.36	1.06	1.31	1.49	0.99	0.481	0.801	0.217	0.743

¹ Η σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων στόχων υπολογίστηκε βάση της μελέτης του Pfaffl et al. (2001) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH.

² Τύπος σιτηρεσίου (Α, Β και C): για κάθε φάση ανάπτυξης ο τύπος σιτηρεσίου Α είναι ο βέλτιστος σε ενέργεια και πρωτεΐνη, ενώ οι τύποι σιτηρεσίου Β και C υπολείπονται του Α σε ενέργεια και πρωτεΐνη κατά 3 και 6% αντίστοιχα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για τον τύπο σιτηρεσίου (ΤΣ) αντιπροσωπεύουν τιμές από n=10 επαναλήψεις για κάθε τύπο (πχ. 5 από Α+ 5 από ΑΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές με διαφορετικό εκθέτη (Α, Β) για τον τύπο σιτηρεσίου διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

³ Προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (0 mg/kg και 125 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ1) αντιπροσωπεύουν τιμές από n=15 επαναλήψεις (πχ. 5 από ΑΦΣ1 + 5 από ΒΦΣ1+ 5 από CΦΣ1). Εντός της ίδιας σειράς τιμές διαφορετικό εκθέτη (a,b) για την προσθήκη ΦΣ1 διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

⁴ Τυπικό σφάλμα μέσων.

7.4 Συζήτηση-σχολιασμός

Σκοπός της τέταρτης μελέτης, αποτέλεσε η πιο ολοκληρωμένη και σε βάθος διερεύνηση των αποτελεσμάτων της πρώτης μελέτης στην οποία διερευνήθηκαν οι επιδράσεις της προσθήκης του ΦΣ1 σε συνδυασμό με την χορήγηση των τριών προαναφερθέντων τύπων σιτηρεσίου (Α, Β και C), επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος και στο κρέας των ορνιθίων. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, τέθηκε ο στόχος της περαιτέρω διερεύνησης των μηχανισμών δράσης του ΦΣ1 αλλά των συνεπειών της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στο σιτηρέσιο σε μοριακό επίπεδο αλλά και στη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας, μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων στο εντερικό περιβάλλον (ειλεός, τυφλά έντερα) αλλά και της έκφρασης στο εντερικό επιθήλιο των ορνιθίων μοριακών βιοδεικτών όπως οι υποδοχείς Toll-like και οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου των οποίων όπως έχει προαναφερθεί και στο 2^ο κεφάλαιο, η δράση είναι μεταξύ άλλων συνδεδεμένη με την εντερική ακεραιότητα. Τέλος στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν και οι συνέπειες των παραπάνω εξεταζόμενων παραγόντων επί του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω του προσδιορισμού της έκφρασης επιλεγμένων προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών σε δευτερογενή λεμφικά όργανα των ορνιθίων όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες των τυφλών εντέρων.

Αναφορικά με την επιλογή των εξεταζόμενων πληθυσμών βακτηρίων των οποίων τα επίπεδα διερευνήθηκαν στο εντερικό επιθήλιο, είναι γνωστό ότι στον ειλεό των ορνιθίων τα κυρίαρχα είδη για τα μεν gram θετικά βακτήρια είναι αυτά που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και για τα μεν gram αρνητικά βακτήρια είναι αυτά που ανήκουν στο γένος *Enterococcus* (Lu et al., 2003; Lan et al., 2004). Στα τυφλά έντερα των ορνιθίων τα κυρίαρχα gram θετικά είδη βακτηρίων ανήκουν στο γένος *Clostridiaceae* και για τα αντίστοιχα gram αρνητικά τα είδη που ανήκουν στο γένος *Bacteroides* (Lu et al., 2003; Lan et al., 2004). Ως αποτέλεσμα αυτών, προσδιορίστηκαν μοριακά με τη βοήθεια της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου τα επίπεδα των πληθυσμών των πιο κυρίαρχων gram θετικών και αρνητικών βακτηριακών ειδών στον εντερικό επιθήλιο και στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων των ορνιθίων.

Αναφορικά με τις επιδράσεις του τύπου του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1 επί της εντερικής μικροχλωρίδας, στην παρούσα μελέτη, φαίνεται τα αποτελέσματα να συγκεντρώνονται κυρίως επί των επιπέδων των βακτηριακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο σε σύγκριση με τις αντίστοιχες επί των πληθυσμών των βακτηρίων στο εντερικό περιεχόμενο. Επιπρόσθετα, ο τύπος του σιτηρεσίου παρουσίασε τις κυριότερες επιδράσεις του επί των συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών στο επιθήλιο του ειλεού ενώ παράλληλα η προσθήκη ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση των επιπέδων βακτηριακών πληθυσμών βακτηρίων στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων. Είναι γνωστό ότι, η ποικιλία των βακτηριακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας επηρεάζεται μεταξύ άλλων παραγόντων από την σύσταση και τον τύπο του σιτηρεσίου που χορηγείται στα ορνίθια (Apajalahti *et al.*, 2001; Van der Wielen *et al.*, 2002; Lan *et al.*, 2004). Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι χαμηλά κάτω του βέλτιστου επίπεδα ΟΠ επηρεάζουν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας στο εντερικό περιεχόμενο των ορνιθίων (Laudadio *et al.*, 2012). Τέλος, τα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ καθώς επίσης και η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου έχει αναφερθεί σε πληθώρα μελετών ότι, επηρεάζουν στα ορνίθια την ποικιλία των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας (Apajalahti *et al.*, 2004 Lan *et al.*, 2004; Laudadio *et al.*, 2012; Awad *et al.*, 2016). Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάστηκαν σε συμφωνία με τα παραπάνω, επιδράσεις του τύπου του σιτηρεσίου επί των επιπέδων των πληθυσμών των συνολικών βακτηρίων, των *Lactobacillus* spp και των *Clostridium* cluster XIVa στο επιθήλιο του ειλεού, καθώς επίσης και των επιπέδων του πληθυσμού των *Lactobacillus* spp στο ειλεακό εντερικό περιεχόμενο. Παρόλα αυτά, τα παραπάνω αποτελέσματα δεν παρουσίασαν κάποια σύνδεση με το μοτίβο ελάττωσης των ΜΕ και ΟΠ στο σιτηρέσιο, καθώς η πλειοψηφία των διαφορών των επιπέδων των βακτηριακών πληθυσμών στον ειλεό (είτε στο επιθήλιο, είτε στο περιεχόμενο του) έδειξε ότι τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Β παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των αντίστοιχων πληθυσμών συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α και C. Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι είναι πολύ δύσκολη η απλή πρόβλεψη των επιδράσεων των εφαρμοζόμενων τύπων σιτηρεσίου επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας λόγω των αλληλεπιδράσεων των πληθυσμών των βακτηρίων με τον ξενιστή αλλά και της πολυπλοκότητας που εμφανίζει στις λειτουργίες του το εντερικό περιβάλλον (Choct 2009; Flint *et al.* 2014).

Αναφορικά με την επίδραση της προσθήκης ΦΣ1 επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, τα επίπεδα των περισσότερων των βακτηριακών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων (*Bacteroides* spp., *Clostridium* cluster IV, *Clostridium* cluster XIVa, *Lactobacillus* spp. και συνολικά βακτήρια total) ήταν σημαντικά αυξημένα ($P \leq 0.05$) ή παρουσίασαν τάση για αύξηση ($P < 0.1$) με την προσθήκη του ΦΣ1 στο σιτηρέσιο των ορνιθίων. Επιπρόσθετα, η προσθήκη του ΦΣ1 έδειξε να επηρεάζει και τα επίπεδα πληθυσμών των *Bifidobacterium*, *Clostridium* cluster IV και *Clostridium* cluster XIVa στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων όπως φάνηκε από τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίστηκαν μεταξύ των δύο εξεταζόμενων παραγόντων (τύπος σιτηρεσίου και προσθήκη ΦΣ1) με την επίδραση αυτή να αφορά αποκλειστικά τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C. Πιο συγκεκριμένα στα ορνίθια της επέμβασης CΦΣ1 να παρουσιάστηκαν χαμηλότερα επίπεδα για τους προαναφερθέντες βακτηριακούς πληθυσμούς συγκριτικά με την επέμβαση C στην οποία δε χορηγήθηκε ΦΣ1.

Οι επιδράσεις της προσθήκης φυτοβιοτικών επί της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας μεταξύ άλλων είναι γνωστό ότι εξαρτώνται από τη σύσταση τους, τα επίπεδα προσθήκης τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων, τον τύπο του βασικού σιτηρεσίου αλλά και τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της εκτροφής (Cross *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2007; Mountzouris *et al.*, 2011), και δύναται να παρουσιάζουν διακυμάνσεις. Έτσι σε ορισμένες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη των φυτοβιοτικών είναι δυνατόν να μην παρουσιάζει καμία επίδραση επί σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας (Cross *et al.*, 2007; Hashemipour *et al.*, 2014; Kirkpinar *et al.*, 2011) ενώ σε άλλες διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη τους είχε ευεργετική επίδραση ευνοώντας την ανάπτυξη ωφέλιμων πληθυσμών βακτηρίων (Cross *et al.*, 2007; Mountzouris *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Hashemipour *et al.*, 2016). Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη των Michiels *et al.* (2007h) διαπιστώθηκε ότι η καρβακρόλη και θυμόλη πιθανόν να έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών *in vitro* με παρόμοιο τρόπο και με την κατάλληλη αναλογία χορήγησης να παρουσιάζουν τα ίδια αποτελέσματα και συνεργιστικά. Επιπρόσθετα, στη μελέτη των Wati *et al.* (2015) διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων θυμαριού, μάραθου, γλυκάνισου, μέντας και γαρύφαλλου επηρεάζει την σύσταση των βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων προκαλώντας αύξηση του αριθμού των ωφέλιμων-όπως είδαμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο- για το εντερικό περιβάλλον των ορνιθίων βακτηρίων *Lactobacillus* spp.

και υποομάδων του γένους *Clostridiaceae* και αντίστοιχη ελάττωση στα παθογόνα *Salmonella enteritidis* και *Escherichia coli* (Wati et al., 2015). Παρόμοια ευεργετικά αποτελέσματα επί των πληθυσμών των βακτηρίων του γένους *Clostridiaceae* έχουν διαπιστωθεί και με προσθήκη φυτοβιοτικών στο σιτηρέσιο ποντικών, όπως η ανηθόλη, η καρβακρόλη, η κινναμαλδεύδη, και η ευγενόλη (Wlodarska et al., 2015). Οι αυξήσεις αυτές των βακτηρίων του γένους *Clostridiaceae*, δύναται να είναι ωφέλιμες για τα ορνίθια, καθώς τα βακτήρια του προαναφερθέντος γένους παρουσιάζουν την ικανότητα, να συμμετέχουν στη διατήρηση της καλής λειτουργίας του εντερικού περιβάλλοντος κυρίως του παχέος και των τυφλών εντέρων (Lopetuso et al., 2013). Αντίθετα και δεδομένου ότι, οι επιδράσεις της προσθήκης φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των ορνιθίων επί της σύνθεσης της εντερικής τους μικροχλωρίδας, ποικίλλουν όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη μιγμάτων φυτογενών συστατικών στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, τα οποία περιείχαν καρβακρόλη ως ένα από τα κύρια ενεργά τους συστατικά, είχε ως αποτέλεσμα μείωση των πληθυσμών *Clostridium perfringens* στο λεπτό και στα τυφλά έντερα (Mitsch et al., 2004; Cho et al., 2014), ενισχύοντας όμως την σταθερότητα των υπολοίπων βακτηριακών πληθυσμών του εντερικού οικοσυστήματος (Mitsch et al., 2004) και προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο όπως αναφέρθηκε βελτιώσεις στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών.

Η προσθήκη ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα μεταβολές στα επίπεδα των πληθυσμών των *Clostridium* clusters IV και XIVa στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν ωφέλιμες για τα ορνίθια λόγω του ότι αποτελούν κυρίαρχη κατηγορία βακτηριακών πληθυσμών (Lu et al 2003, Lan et al., 2004) στα τυφλά έντερα αλλά και του ρόλου τους ως ρυθμιστών της διατήρησης της καλής εντερικής λειτουργίας (Lopetuso et al., 2013) όπως προαναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο.

Όπως παρατηρήθηκε, η πλειοψηφία των επιδράσεων της προσθήκης ΦΣ1 στην παρούσα μελέτη επί της σύστασης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας αφορούσε κυρίως εκτός των *Bacteroides* gram θετικά βακτήρια. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να μπορεί να εξηγηθεί από την ιδιότητα που παρουσιάζουν τα αιθέρια έλαια, τα συστατικά και τα μίγματα τους, ύστερα από προσθήκη στα σιτηρέσια των ορνιθίων να εμφανίζουν πιο ισχυρές επιδράσεις επί των gram θετικά βακτηρίων συγκριτικά με τις αντίστοιχες επί των gram αρνητικών βακτηρίων (Inoye et al., 2001; Brenes and Roura., 2010), διότι τα gram αρνητικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά στην

καταστροφή των κυτταροπλασματικών τους μεμβρανών συγκριτικά με τους πληθυσμούς των gram θετικών βακτηρίων (Foley *et al.*, 1987).

Όπως γίνεται αντιληπτό, από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, η παρούσα μελέτη παρείχε νέα δεδομένα σχετικά με τα αποτελέσματα της προσθήκης του χρησιμοποιηθέντος ΦΣ1 επί της σύστασης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, με τα αποτελέσματα αυτά να συσσωρεύονται κυρίως στα τυφλά έντερα συγκριτικά με τον ειλεό. Για την εξήγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι δρόμοι αλλά και η κινητική εντός του οργανισμού των συστατικών του ΦΣ1 (Michiels *et al.*, 2007), η απορρόφηση τους στο πεπτικό καθώς επίσης και η φυσιολογία του συγκεκριμένου οργανισμού των ορνιθίων και πως όλοι αυτοί οι παράγοντες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Αναφορικά με τη μέχρι σήμερα γνώση σχετικά με την απορρόφηση των φυτογενών βιοενεργών συστατικών στον εντερικό σωλήνα είναι περιορισμένη. Πιο συγκεκριμένα, σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται ότι η απορρόφηση στις περιπτώσεις της καρβακρόλης και της θυμόλης πραγματοποιείται κυρίως στο στομάχι και στα αρχικά τμήματα του εντέρου όπως ο δωδεκαδάκτυλος (Michiels *et al.*, 2008; Brenes and Roura, 2010) ενώ σε άλλες όπως στην περίπτωση του γνωστού φλαβονοειδούς κερκετίνη που περιέχεται σε φρούτα και λαχανικά (Suzuki and Hara, 2011) στα τελευταία τμήματα (τυφλά έντερα, παχύ έντερο) του εντέρου (Aura *et al.*, 2002; Suzuki and Hara, 2011). Επιπρόσθετα, στα πτηνά έχει διαπιστωθεί ότι, τα μη απορροφηθέντα συστατικά των αιθέριων ελαίων και οι μεταβολίτες τους στα ούρα πιθανόν να ασκούν επίδραση επί της μικροβιακής χλωρίδας στα τυφλά έντερα των πτηνών (Sacranie *et al.*, 2012). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι, η ευεργετική επίδραση των φυτοβιοτικών επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας των ορνιθίων παρόλο που είναι πλέον σχεδόν δεδομένη, οι ακριβείς μηχανισμοί οι οποίοι την διέπουν είναι αναγκαίο να μελετηθούν περαιτέρω κυρίως σε μοριακό επίπεδο (Jang *et al.*, 2007; Michiels *et al.*, 2008).

Αναφορικά με τις οδούς μεταγωγής σημάτων στο εντερικό επιθηλιακό κύτταρο και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτές, κυρίαρχο ρόλο όπως προαναφέρθηκε και στο 2^ο κεφάλαιο διαδραματίζουν οι υποδοχείς Toll-like. Οι υποδοχείς Toll-like μπορούν να ταξινομηθούν σε υποοικογένειες ανάλογα με τα είδη των μικροβιακών παραγόντων που εντοπίζουν. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like 2 και 4 (TLR2, TLR4) στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων, με έναν από τους σκοπούς αυτής του προσδιορισμού

να είναι, η σύνδεση των αποτελεσμάτων, με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της εντερικής μικροχλωρίδας. Αυτό συμβαίνει διότι οι εξεταζόμενοι υποδοχείς Toll-like (TLR2 και TLR4) έχουν την ιδιότητα ο μὲν TLR2 να αναγνωρίζει τα λιποτειχοϊκά οξέα, τις λιποπρωτεΐνες και την πεπτιδογλυκάνη των gram θετικών βακτηρίων και ο TLR4 τα gram-αρνητικά βακτήρια μέσω των λιποπολυσακχαριτών τους (Du et al., 2016). Επιπρόσθετα, μετά τη διέγερσή τους, οι υποδοχείς toll-like ενεργοποιούν ενδοκυττάρειες οδούς μεταγωγής μηνυμάτων και πιο συγκεκριμένα, προκαλείται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις (TNF-γ, IL-1β, IL-6, IL-8 και IL-12 και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (πχ. IL-10 και TGF-β4) (Kawai and Akira., 2007; Keestra et al., 2013).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι, η ελάττωση των επιπέδων ME στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής έχει ως αποτέλεσμα πιθανή πτώση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων Toll-like στο εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Yang et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη, η ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ επηρέασε τη σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων TLR2 στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C να παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης TLR2 συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου A. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση του τύπου σιτηρεσίου επί της σχετικής γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, στις τιμές του οποίου παρουσιάστηκε τάση ($P < 0.1$) μεταβολής των τιμών της έκφρασης του στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων των ορνιθίων με παρόμοιο τρόπο με την επίδραση του τύπου του σιτηρεσίου στην έκφραση των υποδοχέων TLR2. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς όπως προαναφέρθηκε οι υποδοχείς Toll-like εμπλέκονται με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Kawai and Akira, 2007; Keestra et al., 2013) ενώ όλα τα παραπάνω δύναται να συνδεθούν και με τις αρχικές ενδείξεις της προαναφερθείσας μελέτης των Yang et al. (2015), οι οποίες συνέδεαν την ελάττωση των επιπέδων ME με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων Toll-like στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα των ορνιθίων.

Ανεξάρτητα από την επίδραση του τύπου του σιτηρεσίου, τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TLR2 παρουσίασαν σημαντική ελάττωση με την προσθήκη ΦΣ1 στα σιτηρέσια των ορνιθίων στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων κατά 60 και 66% αντίστοιχα, συγκριτικά με τις επεμβάσεις στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε

χορήγηση ΦΣ1. Σε αντίθεση με τις επιδράσεις του τύπου του σιτηρεσίου επί της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, δεν παρουσιάστηκαν επιδράσεις της προσθήκης ΦΣ1 ούτε στο επιθήλιο του ειλεού, ούτε στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων επί της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Παρόλα αυτά, μια αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο εξεταζόμενων παραγόντων, δηλαδή του τύπου του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1 παρουσιάστηκε στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει αναφερθεί, ελάττωση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων Toll-like στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων με την προσθήκη φυτοβιοτικών και πιο συγκεκριμένα των TLR2 (Du *et al.*, 2016) και TLR4 (Lu *et al.*, 2014) ύστερα από προσθήκη φυτογενών συστατικών όπως θυμόλη και καρβακρόλη. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Du *et al.* (2016), η προσθήκη ενός φυτοβιοτικού βασισμένου σε θυμόλη και καρβακρόλη είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης υποδοχέων TLR2 στο επιθήλιο του ειλεού των ορνιθίων συγκριτικά με την επέμβαση του μάρτυρα. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ενός φυτοβιοτικού με κύρια βιοενεργά συστατικά των καρβακρόλη, τη θυμόλη, το χ-τερπινένιο και το π-κυμένιο είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TLR4 συγκριτικά πάντα με την επέμβαση στην οποία δε χορηγήθηκε το φυτοβιοτικό, στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Lu *et al.*, 2014).

Η ελάττωση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων Toll-like με την προσθήκη φυτοβιοτικών, μπορεί να συνδεθεί, με τον περιορισμό της φλεγμονώδους απόκρισης και όπως αναφέρεται από τους Kawai and Akira. (2007), υπάρχουν ενδείξεις ότι τα φυτοβιοτικά—όπως είδαμε και στις παραπάνω μελέτες— δύνανται να την προκαλούν, ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση (Brenes and Roure, 2010). Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των φυτοβιοτικών που αναφέρθηκε και στο 2^ο Κεφάλαιο είναι αυτός ο οποίος παρουσιάζεται στην μελέτη των Lillehoj and Lee, (2012), οι οποίοι υποστηρίζουν ότι οι ουσίες αυτές εμποδίζουν απευθείας την ενεργοποίηση των υποδοχέων Toll-like στην επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου και κατά συνέπεια και όλων των παραγόμενων από την οδό του MyD88 πρωτεϊνών όπως του NF-κΒ και των κυτταροκινών της φλεγμονώδους απόκρισης. Επιπρόσθετα, στη μελέτη τους οι Lillehoj and Lee. (2012), αναφέρουν ότι στα ποντίκια η προσθήκη κουρκουμίνης και κινναμυλδεΰδης προκάλεσε παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των υποδοχέων TLR4, παρεμποδίζοντας τον ολιγομερισμό του υποδοχέα και συμβάλλοντας έτσι στην μη ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής

μηνυμάτων από την οδό του MyD88 πρωτεϊνών. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συνηγορούν στο γεγονός ότι, τα φυτοβιοτικά πιθανόν να συμβάλλουν στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στο εντερικό περιβάλλον παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των υποδοχέων Toll-like.. Τέλος, αναφορικά με τους υποδοχείς Toll-like στην παρούσα μελέτη, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πληθυσμών των στελεχών των *Clostridium* IV και XIVa στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, από την προσθήκη ΦΣ1, πιθανόν να μπορεί να συνδεθεί με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TLR2, παρέχοντας έτσι νέα στοιχεία για την ευεργετική επίδραση της προσθήκης των φυτοβιοτικών επί της αύξησης των πληθυσμών, των ωφέλιμων για το εντερικό περιβάλλον στελεχών του γένους *Clostridium* (Lopetuso *et al.*, 2013).

Ο προσδιορισμός των επιδράσεων προσθήκης των φυτοβιοτικών επί της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού αποτελεί ένα σχετικά νέο τομέα διερεύνησης στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Όπως είδαμε και στο 2^ο κεφάλαιο, το βλεννογόνο του λεπτού εντέρου γνωστό και ως εντερικός φραγμός αποτελεί μια επιφάνεια με κύριες λειτουργίες την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και την παροχή ενός αποτελεσματικού φραγμού έναντι των αντιγόνων που εισέρχονται στο εντεροκύτταρο. Η επιφάνεια εντεροκυττάρων, περιέχει ένζυμα υπεύθυνα για την υδρόλυση των ολιγοσακχαριτών και των πεπτιδίων με τα προϊόντα της δράσης τους να απορροφώνται στο εσωτερικό του εντεροκυττάρου από μηχανισμούς που εμπλέκουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες μεταφοράς. Ο παρακυψελιδικός χώρος είναι σφραγισμένος με σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (tight junctions, TJs) οι οποίες ρυθμίζουν τη ροή ιόντων νερού και μικρών μορίων (Cummings *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2014), με τα υδατοδιαλυτά συστατικά να διέρχονται της κυτταρικής μεμβράνης με παθητική μεταφορά μέσω πόρων (διακυτταρική μεταφορά) ή να εισέρχονται παράπλευρα μέσω των συμπλόκων των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (tight junctions) ανάμεσα στα εντεροκύτταρα (παρακυτταρική μεταφορά) (Cummings *et al.*, 2004). Τα σύμπλοκα πρωτεϊνών στενού συνδέσμου αποτελούνται μεταξύ άλλων από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες οκλουδίνες (OCLNs) και κλαουδίνες (CLDNs) οι οποίες είναι συνδεδεμένες με διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων τις zonula οκλουδίνες (ZO) ZO-1, ZO-2, ZO-3 οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν γειτονικά κύτταρα μέσω του κυτταροσκελετού. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες συσχετίζονται με διαδικασίες σηματοδότησης και 'αγκύρωσης' του δεσμοσώματος στα μικροϊνίδια ακτίνης του κυτταρικού σκελετού σε αντίθεση με τις κλαουδίνες (CLDNs) οι οποίες αποτελούνται από

σφραγιστικά μόρια και πόρους που διευκολύνουν τη μεταφορά νερού και ηλεκτρολυτών (Suzuki and Hara., 2011; Song *et al.*, 2014). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι, για καλύτερη αξιολόγηση της ομαλής λειτουργίας του εντερικού επιθηλιακού φραγμού είναι απαραίτητος κυρίως ο προσδιορισμός της έκφρασης των επιπέδων οκλουδίνης (OCLN) και zonula οκλουδίνης 1 (ZO-1) στο εντερικό επιθήλιο καθώς μαζί με την κλαουδίνη 1 αποτελούν μερικούς από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ρύθμισης της λειτουργίας του εντερικού φραγμού (Liu *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014).

Αναφορικά με τον τύπο του σιτηρεσίου, δεν παρουσιάστηκε σημαντική επίδραση του επί καμίας εκ των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου στον ειλεό, με περιορισμένη επίδραση του να παρατηρείται μόνο στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων όπου εντοπίστηκε υψηλή σχετική έκφραση της CLDN5 για τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου C. Αντίθετα, η προσθήκη ΦΣ1 παρουσίασε πιο σημαντική επίδραση επί της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου προκαλώντας αυξημένες τιμές έκφρασης της ZO2 στο επιθήλιο του ειλεού καθώς επίσης και των τιμών έκφρασης για τις CLDN1 (τάση), CLDN5 και OCLN στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων. Τα φυτοβιοτικά, έχει αναφερθεί ότι ενισχύουν την εντερική ακεραιότητα αυξάνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (Suzuki and Hara, 2011; Zou *et al.*, 2016) το οποίο έχει ως πιθανό αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη προστασία του εντερικού επιθηλίου από παθογόνα βακτήρια, τοξικά συστατικά των τροφών και ενδογενώς παραγόμενων τοξικών μεταβολιτών (Placha *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί αύξηση της έκφρασης της οκλουδίνης στο εντερικό επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου (Platcha *et al.*, 2014) και του ειλεού (Du *et al.*, 2016) ύστερα από προσθήκη αιθέριων ελαίων θυμόλης και μίγματος αιθέριων ελαίων θυμόλης και καρβακρόλης αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη, η αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, όπως είδαμε και παραπάνω δείχνει ότι η προσθήκη ΦΣ1 έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της εντερικού φραγμού. Παρόλα αυτά, τα φυτοβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού ρυθμίζοντας το σύμπλοκο πρωτεϊνών στενού συνδέσμου χωρίς απαραίτητα να αυξάνεται και η σχετική γονιδιακή τους έκφραση στο εντερικό επιθήλιο (Suzuki and Hara, 2011). Ο παραπάνω τρόπος ενίσχυσης του εντερικού φραγμού από τα φυτοβιοτικά μπορεί να εξηγηθεί δια της εμπλοκής των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου στις οδούς μεταγωγής

μηνυμάτων των υποδοχέων Toll like (Kawai and Akira, 2007; Ulluwishewa *et al.*, 2011) αλλά και σε άλλες οδούς μεταφοράς μηνυμάτων οι οποίες συνδέονται με την παραγωγή προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών (Du *et al.*, 2016). Πιο συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα εμπλέκονται με την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες με τη σειρά τους εμπλέκονται σε διάφορες οδούς μεταγωγής μηνυμάτων. Οι πρωτεϊνικές κινάσες εκτός της σύνδεσης τους με την ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, εμπλέκονται και στην οδό μεταγωγής μηνυμάτων στην οποία συμμετέχουν και οι υποδοχείς Toll-like. Ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων Toll-like έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών PKCa και PKCδ με άμεσο αποτέλεσμα επί την ενίσχυση της εντερικής ακεραιότητας μέσω της αναδιάταξης και ανακατανομής των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου ZO1 και OCLN (Ulluwishewa *et al.*, 2011).

Παρόλα αυτά κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω μηχανισμών για την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, η φυσιολογική σημασία της αύξησης της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου από την προσθήκη ΦΣ1, θα πρέπει να εξηγηθεί σε συνδυασμό με την τάση για ευεργετική επίδραση της προσθήκης του ΦΣ1 επί του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής καθόλη τη διάρκεια της πρώτης μελέτης (Paraskeuas *et al.* 2016), της σύνθεσης των βλεννοπρωτεϊνών στο εντερικό επιθήλιο σε προηγούμενα πειράματα με την προσθήκη φυτοβιοτικού παρόμοιας σύστασης (Tsirtsikos *et al.*, 2012) καθώς επίσης και της επίδρασης της προσθήκης ΦΣ1 επί των μικροβιακών πληθυσμών στο εντερικό περιβάλλον.

Ο τύπος του σιτηρεσίου, επηρέασε σημαντικά την σχετική γονιδιακή έκφραση του αντιφλεγμονώδους αυξητικού παράγοντα TGF-β4 στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων καθώς επίσης παρουσιάστηκε μια αλληλεπίδραση μεταξύ της προσθήκης ΦΣ1 και του τύπου του σιτηρεσίου για την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-2 στο σπλήνα. Στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου B, στην περίπτωση του αυξητικού παράγοντα TGF-β4 παρουσιάστηκαν οι χαμηλότερες τιμές έκφρασης ενώ αντίθετα στην περίπτωση της κυτταροκίνης IL-2 οι υψηλότερες, συγκριτικά με τις αντίστοιχες που παρουσιάστηκαν στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκαν τα σιτηρέσια τύπου A και C. Παρόλα αυτά οι μεταβολές αυτές δεν είναι σε συμφωνία με την αντίστοιχη ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ στους χορηγούμενους στα ορνίθια τύπους σιτηρεσίων A, B και C. Μια πιθανή εξήγηση για τις παραπάνω μεταβολές, μπορεί να αποτελέσει η ελάττωση των επιπέδων των ευεργετικών για τα ορνίθια

πληθυσμών βακτηρίων *Lactobacillus* και *Clostridium* cluster XIV στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Β συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο τύπου Α και C. Αυτό συμβαίνει διότι, έχει αναφερθεί πως ευεργετικοί πληθυσμοί βακτηρίων όπως οι προαναφερθέντες σχετίζονται άμεσα με την ύπαρξη υγιούς εντερικού περιβάλλοντος και την ελάττωση της φλεγμονώδους απόκρισης στα ορνίθια (Wlondarska *et al.*, 2015; Awad *et al.*, 2016).

Παρόλα αυτά, η απουσία άλλων επιδράσεων του τύπου του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΣ1 επί της πλειοψηφίας των προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών και παραγόντων που προσδιορίστηκαν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα στην παρούσα μελέτη και πιο συγκεκριμένα στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων και στο σπλήνα πιθανόν να μπορούν να συσχετιστούν με την απουσία επιμόλυνσης με κάποιο παθογόνο παράγοντα των ορνιθίων του πειράματος και κατά συνέπεια την έλλειψη διέγερσης της ανοσοβιολογικής τους απόκρισης. Από την άλλη πλευρά, μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η συνολική ευεργετική επίδραση της προσθήκης ΦΣ1 επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας και ιδιαίτερα των βακτηρίων στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, της έκφρασης των υποδοχέων Toll-like, της εντερικής ακεραιότητας μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, επιδράσεις οι οποίες δύναται να σχετίζονται με την ελάττωση εμφάνισης φλεγμονώδους απόκρισης.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη παρείχε νέες πληροφορίες σύμφωνα με τις οποίες ο τύπος του σιτηρεσίου και η προσθήκη ΦΣ1 επηρεάζουν περισσότερο τα επίπεδα πληθυσμών των βακτηρίων στο εντερικό επιθήλιο από ότι αυτά στο περιεχόμενο του εντέρου. Επιπρόσθετα, οι επιδράσεις του τύπου του σιτηρεσίου εντοπίστηκαν κυρίως επί των πληθυσμών βακτηρίων στο επιθήλιο του ειλεού, ενώ οι επιδράσεις της προσθήκης ΦΣ1 εντοπίστηκαν επί των πληθυσμών των βακτηρίων στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων. Η ενίσχυση των επιπέδων των πληθυσμών των στελεχών του γένους *Clostridia* και πιο συγκεκριμένα των *Clostridium* clusters IV και XIVa στο εντερικό επιθήλιο των τυφλών εντέρων, σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TLR2 και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, παρέχουν περαιτέρω αποδεικτικά στοιχεία για την θετική επίδραση της προσθήκης ΦΣ1 στο εντερικό περιβάλλον των ορνιθίων. Το γεγονός αυτό, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος στα

οποία η προσθήκη ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τάση για βελτίωση του συνολικού συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής.

Το μεγαλύτερο μέρος της τέταρτης μελέτης περιέχεται στη δημοσίευση: Paraskeuas and Mountzouris 2019b (Παράρτημα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο ΜΕΛΕΤΗ 5

Τίτλος: Επιδράσεις του χορηγούμενου είδους δημητριακού καρπού στο βασικό σιτηρέσιο και των επιπέδων προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών επί της εντερικής μικροχλωρίδας και γονιδίων που σχετίζονται με την εντερική υγεία και ακεραιότητα.

8. 1. Σκοπός

Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των ορνιθίων (Brenes and Roura 2010; Paraskeuas *et al.*, 2016) και ειδικότερα, το είδος των χρησιμοποιούμενων δημητριακών καρπών οι οποίοι καταλαμβάνουν και το μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής στα καταρτιζόμενα για τα ορνίθια κρεοπαραγωγής σιτηρέσια. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συλλογή περαιτέρω πληροφοριών σχετικά με τις επιδράσεις του είδους του χορηγούμενου στο βασικό σιτηρέσιο δημητριακού καρπού σε συνδυασμό με τα επίπεδα προσθήκης ενός μίγματος φυτογενών συστατικών επί της σύνθεσης των πληθυσμών των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των προαναφερθέντων παραγόντων επί της σχετικής γονιδιακής έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την εντερική υγεία και ακεραιότητα όπως, οι υποδοχείς Toll-like (TLR), οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου (ZO-1, ZO-2, CLDN1, CLDN5 and OCLN), η βλεννοπρωτεΐνη 2 (MUC2) και η ανοσοσφαιρίνη A (IgA) στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων.

8. 2. Υλικά και Μέθοδοι

8.2.1 Ζωικό υλικό και Πειραματικές επεμβάσεις

Οι μελέτες 2 και 3 είχαν διενεργηθεί παράλληλα, στον ίδιο πειραματικό χώρο, με νεοσσούς της ίδιας παρτίδας εκκόλαψης και με σιτηρέσια για την κατάρτιση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν κοινές πρώτες ύλες και ουσιαστικά διέφεραν μόνο ως προς τον δημητριακό καρπό. Έτσι προκειμένου να γίνει η συγκεκριμένη μελέτη οι δυο προαναφερθέντες μελέτες αναλύθηκαν περαιτέρω ως ενιαία μελέτη έχοντας ως κύριους παράγοντες το είδος δημητριακού καρπού και τη προσθήκη ΦΣ2. Κατά συνέπεια αναλόγως του είδους του δημητριακού καρπού δηλαδή αραβόσιτου (Α) ή σιταριού (Σ) που χορηγήθηκε και των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 (0, 100 και 150 mg/kg) στο βασικό σιτηρέσιο, η εν λόγω μελέτη είχε τις ακόλουθες 6 πειραματικές επεμβάσεις: Α-0 (αραβόσιτος χωρίς προσθήκη ΦΣ2 στο βασικό σιτηρέσιο), Α-100 (αραβόσιτος με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg/kg σιτηρέσιο), Α-150 (αραβόσιτος με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg/kg σιτηρέσιο), Σ-0 (σιτάρι χωρίς προσθήκη ΦΣ2 στο σιτηρέσιο), Σ-100 (σιτάρι με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg/kg σιτηρέσιο) και Σ-150 (σιτάρι με προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg/kg σιτηρέσιο). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η σύσταση των σιτηρεσίων και οι λοιπές λεπτομέρειες είναι ακριβώς ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν στα Κεφάλαια 5 (Μελέτη 2) και 6 (Μελέτη 3).

8.2.2 Δειγματοληψία δειγμάτων για μοριακές αναλύσεις

βλ. Κεφάλαιο 7.2.3

8.2.3 Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών στο εντερικό επιθήλιο και περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων

βλ. Κεφάλαιο 7.2.4, Πίνακας 7.1.

8.2.4 Απομόνωση RNA και προσδιορισμός σχετικής έκφρασης γονιδίων στόχων σε επιθήλιο ειλεού και τυφλών εντέρων

βλ. Κεφάλαιο 7.2.5 και Πίνακα 8.1.

8.2.5 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη έγινε με το πρόγραμμα SPSS for Windows version 8.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) με το γενικό γραμμικό μοντέλο (general linear model)-γενική παραγοντική ανάλυση ANOVA (general factorial ANOVA procedure), με παράγοντες το είδος του δημητριακού καρπού (Α ή Σ) και των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 (0, 100 και 150 mg/kg σιτηρεσίου). Επιπρόσθετα, στα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας Kolmogorov – Smirnov. Οι διαφορές εξετάστηκαν περαιτέρω με τα κριτήρια του Tukey's honestly significant difference (HSD) multiple comparison procedure. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $P \leq 0.05$ και επίπεδο των στατιστικά σημαντικών τάσεων στο $P \leq 0.10$.

Πίνακας 8.1. Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην real time- qPCR.

Γονίδιο-Στόχος	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3') ⁹	θ ⁰ C ανόπτησης	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζβ)	Αναφορά αλληλουχίας στο NCBI
GAPDH ¹	F:GCTGAATGGGAAGCTTACTG R: AAGGTGGAGGAATGGCTG	60	216	NM_204305.1
ZO-1 ²	F:TAAAGCCATTCTCTGTAAGCC R: GTTTCACCTTTCTCTTTGTCC	60	243	XM_015278981.1
ZO-2	F: GGCAAATCATTGAGCAGGA R: ATTGATGGTGGCTGTAAAGAG	60	239	XM_015280247.1
CLDN1 ³	F: CTGATTGCTTCCAACCAG R: CAGGTCAAACAGAGGTACAAG	59	140	NM_001013611.2
CLDN5	F:CATCACTTCTCCTTCGTCAGC R:GCACAAAGATCTCCCAGGTC	59	111	NM_204201.1
OCLN ⁴	F:TCATCGCCTCCATCGTCTAC R: TCTTACTGCGCGTCTTCTGG	62	240	NM_205128.1
TLR2 ⁵	F:CTTGGAGATCAGAGTTTGGA R:ATTTGGGAATTTGAGTGCTG	62	238	XM_015301380.1
TLR4	F:GTCTCTCCTTCCTTACCTGCTGTTT R:AGGAGGAGAAAGACAGGGTAGGTG	65	187	NM_001030693.1
NF-κB ⁶	F: TGTGGTTGTCAGGATGGTC R: GGTCTGGTAAAGGTCATTTCTC	62	273	XM_015285418.1
MUC2 ⁷	F: GCTGATTGTCACTCACGCCTT R: ATCTGCCTGAATCACAGGTGC	62 ⁰ C	442	XM_421035
IgA ⁸	F:GTCACCGTCACCTGGACTACA R:ACCGATGGTCTCCTTCACATC	59 ⁰ C	192	S40610

¹ GAPDH = γονίδιο αναφοράς glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

² ZO1,2 = zona occludines 1,2

³ CLDN1,5 = κλαουδίνες 1,5

⁴ OCLN = οκλουδίνη

⁵ NF-κB = μεταγραφικός παράγοντας NF-κB

⁶ TLR2,4 = υποδοχείς Toll-like 2,4

⁷ MUC2=μουκίνη 2

⁸ IgA=ανοσοσφαιρίνη A

⁹ F:Forward (αριστερός εκκινητής), R:Reverse (δεξιός εκκινητής)

8.3 Αποτελέσματα

8.3.1 Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών στο επιθήλιο και στο περιεχόμενο του ειλεού και στον τυφλών εντέρων

Τα επίπεδα των βακτηριακών πληθυσμών που εξετάσθηκαν στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P>0.05$) από το είδος του χρησιμοποιούμενου στο βασικό σιτηρέσιο δημητριακού καρπού (Πίνακας 8.2), εκτός από τα επίπεδα πληθυσμών των *Lactobacillus* spp. στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων τα οποία παρουσιάστηκαν σημαντικά ($P_{\Delta K}=0.007$) υψηλότερα στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο με δημητριακό καρπό σιτάρι συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος. Τα επίπεδα των βακτηριακών πληθυσμών των συνολικών βακτηρίων καθώς επίσης και των *Lactobacillus* spp. *Escherichia coli*, *Bacteroides* spp, και των *Clostridium* cluster XIVa στο περιεχόμενο του ειλεού δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P>0.05$) από το είδος του δημητριακού καρπού και τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 (Πίνακας 8.3). Σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του είδους του χορηγούμενου στο βασικό σιτηρέσιο δημητριακού καρπού (ΔK) και των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 εντοπίστηκαν για τα επίπεδα των πληθυσμών *Bacteroides* spp. ($P_{\Delta K \times \Phi \Sigma}=0.025$) και *Clostridium* cluster IV ($P_{\Delta K \times \Phi \Sigma}=0.048$) στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων. Επιπρόσθετα, τα συνολικά βακτήρια στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων ($P_{\Delta K}=0.004$), καθώς επίσης τα αντίστοιχα *Clostridium* cluster I ($P_{\Delta K}=0.019$), *Clostridium* cluster IV ($P_{\Delta K} \leq 0.001$) και *Clostridium* cluster XIVa ($P_{\Delta K}=0.003$) παρουσιάστηκαν σημαντικά χαμηλότερα στα ορνίθια στα οποία χρησιμοποιήθηκε σιτάρι συγκριτικά με αυτά στα οποία ως δημητριακός καρπός στο βασικό σιτηρέσιο χρησιμοποιήθηκε αραβόσιτος. Τέλος, τα επίπεδα των πληθυσμών των βακτηρίων *Bifidobacterium* spp. ($P_{\Delta K} \leq 0.001$) περιεχόμενο των τυφλών εντέρων παρουσιάστηκαν σημαντικά υψηλότερα στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε στο βασικό σιτηρέσιο σιτάρι σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος (Πίνακας 8.3).

Πίνακας 8.2. Επίπεδα βακτηριακών πληθυσμών στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια 42 ημερών.

Βακτήρια επιθηλίου (log ₁₀ cells/g pellet κυττάρων επιθηλίου) ¹	Είδος δημητριακού καρπού ²		Προσθήκη ΦΣ2 (mg/kg σιτηρεσίου) ³			SEM ⁵	P-values ⁴		
	A	Σ	0	100	150		ΔΚ	ΦΣ	ΔΚ×ΦΣ
Ειλεός									
Συνολικά βακτήρια	7.28	7.40	7.52	7.23	7.26	0.170	0.384	0.195	0.245
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.75	6.40	6.62	6.33	6.77	0.254	0.109	0.236	0.264
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	5.66	5.76	5.82	5.53	5.78	0.200	0.527	0.298	0.576
Τυφλά έντερα									
Συνολικά βακτήρια	8.68	8.62	8.57	8.58	8.78	0.135	0.592	0.233	0.610
<i>Lactobacillus</i> spp.	5.97 ^y	6.42 ^x	6.05	6.09	6.44	0.184	0.007	0.089	0.901
<i>Bacteroides</i> spp.	7.93	8.16	8.11	7.90	8.13	0.181	0.141	0.390	0.368
<i>Clostridium</i> cluster IV	8.23	8.16	8.26	8.12	8.22	0.132	0.526	0.563	0.953
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	8.19	8.25	8.21	8.19	8.27	0.096	0.414	0.699	0.814

¹Η ποσότητα μικροβιακού DNA (cfu) κάθε δείγματος εκφράστηκε σε log₁₀ κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχόμενου ή pellet κυττάρων εντερικού επιθηλίου

² Χρησιμοποιούμενο είδος δημητριακού καρπού (ΔΚ): Αραβόσιτος (Α) ή Σιτάρι (Σ). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την επίδραση του είδους του ΔΚ αντιπροσωπεύουν τιμές από n=15 ορνίθια (π.χ. 5 από την επέμβαση Σ-0 + 5 από την επέμβαση Σ-100 +5 από την επέμβαση Σ-150).

³ Τα επίπεδα προσθήκης του μίγματος φυτογενών συστατικών ΦΣ2 στο σιτηρέσιο (0 mg/kg, 100 mg/kg και 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την επίδραση προσθήκης ΦΣ2 αντιπροσωπεύουν τις τιμές των μέσων από n= 10 ορνίθια (π.χ. 5 από την επέμβαση from treatment A-0 + 5 από την επέμβαση Σ-0).

⁴ Στην ίδια γραμμή τιμές διαφορετικό εκθέτη (x, y) διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$) για το είδος του δημητριακού καρπού

⁵ Τυπικό σφάλμα μέσων.

Πίνακας 8.3. Σύνθεση μικροβιακών πληθυσμών εντερικού περιεχομένου ειλεού και τυφλών εντέρων ορνιθίων 42 ημερών

Δεδομένα (log ₁₀ κυττάρων/g εντερικού περιεχομένου) ¹	Είδος δημητριακού καρπού ²		Προσθήκη ΦΣ2 (mg/kg σιτηρεσίου) ³				P-values ⁴		
	A	Σ	0	100	150	SEM ⁵	ΔΚ	ΦΣ	ΔΚ×ΦΣ
Ειλεός									
Συνολικά βακτήρια	7.96	7.78	8.01	7.83	7.77	0.193	0.263	0.440	0.960
<i>Escherichia coli</i>	5.03	5.23	5.28	5.07	5.05	0.396	0.542	0.812	0.322
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.53	6.33	6.51	6.38	6.40	0.233	0.284	0.828	0.858
<i>Bacteroides</i> spp.	4.26	4.14	4.15	3.92	4.53	0.247	0.563	0.063	0.133
<i>Clostridial</i> cluster XIVa	7.46	7.32	7.49	7.38	7.29	0.231	0.456	0.695	0.886
Τυφλά έντερα									
Συνολικά βακτήρια	10.09 ^x	9.85 ^y	9.86	10.04	10.01	0.089	0.004	0.110	0.132
<i>Escherichia coli</i>	8.16	8.42	8.21	8.29	8.37	0.219	0.163	0.766	0.628
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.40	7.65	7.45	7.48	7.66	0.182	0.109	0.484	0.327
<i>Bifidobacterium</i> spp.	5.26 ^y	6.73 ^x	6.08	5.86	6.06	0.193	0.000	0.455	0.220
<i>Bacteroides</i> spp.	8.01	8.04	7.85	8.14	8.08	0.123	0.719	0.063	0.025
<i>Clostridium</i> cluster I	7.89 ^x	7.62 ^y	7.73	7.66	7.86	0.132	0.019	0.344	0.069
<i>Clostridium</i> cluster IV	9.25 ^x	8.73 ^y	8.90	9.03	9.04	0.157	0.000	0.593	0.048
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	9.74 ^x	9.56 ^y	9.56	9.71	9.68	0.064	0.003	0.067	0.122

¹Η ποσότητα μικροβιακού DNA (cfu) κάθε δείγματος εκφράστηκε σε $\log_{10}$ κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχόμενου ή pellet κυττάρων εντερικού επιθηλίου

² Χρησιμοποιούμενο είδος δημητριακού καρπού (ΔΚ): Αραβόσιτος (Α) ή Σιτάρι (Σ). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την επίδραση του είδους του ΔΚ αντιπροσωπεύουν τιμές από $n=15$ ορνίθια (π.χ. 5 από την επέμβαση Σ-0 + 5 από την επέμβαση Σ-100 +5 από την επέμβαση Σ-150).

³ Τα επίπεδα προσθήκης του μίγματος φυτογενών συστατικών ΦΣ2 στο σιτηρέσιο (0 mg/kg, 100 mg/kg και 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την επίδραση προσθήκης ΦΣ2 αντιπροσωπεύουν τις τιμές των μέσων από $n= 10$ ορνίθια (π.χ. 5 από την επέμβαση from treatment Α-0 + 5 από την επέμβαση Σ-0).

⁴ Στην ίδια γραμμή τιμές διαφορετικό εκθέτη (x, y) για το είδος του δημητριακού καρπού, διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$).

⁵ Τυπικό σφάλμα μέσων.

8.3.2. Σχετική γονιδιακή έκφραση οι υποδοχείς Toll-like, οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου, μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, η μουκίνη 2 και η ανοσοσφαιρίνη Α στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων.

Η σχετική γονιδιακή έκφραση των ZO-1, CLDN1, OCLN, TLR4, NF-κΒ και MUC2 στο επιθήλιο του ειλεού δεν επηρεάστηκε σημαντικά ($P>0.05$) από το είδος του χρησιμοποιούμενου δημητριακού καρπού και τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 στο σιτηρέσιο των ορνιθίων (Πίνακας 8.4). Παρόλα αυτά, σημαντική ($P_{\Delta K \times \Phi S}=0.021$) αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων παρουσιάστηκε για την έκφραση της IgA στο επιθήλιο του ειλεού. Το είδος του δημητριακού καρπού στο βασικό σιτηρέσιο επηρέασε σημαντικά την έκφραση της ZO-2 ($P_{\Delta K}=0.014$), με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι να παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές έκφρασης στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος. Επιπρόσθετα, τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι στο βασικό σιτηρέσιο παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης TLR2 ($P_{\Delta K}=0.004$) και IgA ($P_{\Delta K}=0.003$) στο επιθήλιο του ειλεού συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος. Στο επιθήλιο του ειλεού, τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 στο σιτηρέσιο ορνιθίων επηρέασαν σημαντικά την έκφραση της CLDN5 ($P_{\Phi S}=0.023$) και της MUC2 ($P_{\Phi S}=0.001$), με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg/kg να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στα ορνίθια στα οποία δε χορηγήθηκε ΦΣ2 (Πίνακας 8.4).

Στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων τα επίπεδα της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των ZO-1, CLDN5, OCLN, TLR4, NF-κΒ και MUC2 δεν επηρεάστηκαν ($P>0.05$) ούτε από το είδος του δημητριακού καρπού ούτε από τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 στο σιτηρέσιο των ορνιθίων (Πίνακας 8.4). Το είδος του δημητριακού καρπού που χρησιμοποιήθηκε στην κατάρτιση του βασικού σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά την έκφραση των CLDN1 ($P_{\Delta K}=0.035$), TLR2 ($P_{\Delta K}=0.001$) και IgA ($P_{\Delta K}=0.002$) με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τα αντίστοιχες τιμές στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος. Τέλος, στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 επηρέασαν σημαντικά την έκφραση της TLR2 ($P_{\Phi S}=0.022$), με τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg/kg να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές

έκφρασης συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg/kg και με αυτές των ορνιθίων στα οποία δε χορηγήθηκε ΦΣ2 (Πίνακας 8.4).

Πίνακας 8.4. Σχετική γονιδιακή έκφραση οι υποδοχείς Toll-like, οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου, μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, η μουκίνη 2 και η ανοσοσφαιρίνη A στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων.

	Γονίδιο ¹	Είδος Δημητριακού Καρπού ²		Προσθήκη ΦΣ2 (mg/kg σιτηρεσίου) ³			SEM ⁵	P-values ⁴		
		A	Σ	0	100	150		ΔΚ	ΦΣ	ΔΚ×ΦΣ
Ειλεός	ZO-1	1.00	1.15	1.01	1.24	0.97	0.227	0.435	0.448	0.052
	ZO-2	0.85 ^y	1.23 ^x	0.95	1.18	1.01	0.181	0.014	0.424	0.519
	CLDN1	1.13	1.32	1.06	1.62	0.99	0.438	0.608	0.310	0.818
	CLDN5	1.10	1.10	0.72 ^b	1.60 ^a	0.98 ^{ab}	0.303	0.972	0.023	0.176
	OCLN	0.96	1.29	1.09	1.42	0.87	0.286	0.169	0.176	0.297
	TLR2	2.34 ^x	0.63 ^y	0.77	2.34	1.35	0.649	0.004	0.069	0.107
	TLR4	1.91	1.05	1.28	1.18	1.97	0.538	0.061	0.293	0.082
	NF-κB	1.04	1.21	0.87	1.23	1.28	0.310	0.506	0.363	0.968
	MUC2	1.17	1.22	0.87 ^b	1.74 ^a	0.96 ^b	0.212	0.770	0.001	0.486
	IgA	1.51 ^x	0.79 ^y	0.85	1.38	1.23	0.269	0.003	0.154	0.021

Τυφλά έντερα										
	ZO-1	1.57	1.08	1.19	1.76	1.03	0.330	0.083	0.085	0.488
	ZO-2	1.23	1.39	1.24	1.26	1.42	0.360	0.599	0.861	0.716
	CLDN1	1.69 ^x	1.04 ^y	1.37	1.62	1.10	0.353	0.035	0.361	0.077
	CLDN5	1.40	1.47	1.80	1.55	0.95	0.492	0.866	0.227	0.954
	OCLN	1.56	1.25	1.50	1.84	0.88	0.430	0.378	0.098	0.209
	TLR2	2.84 ^x	0.93 ^y	2.44 ^a	2.40 ^a	0.82 ^b	0.618	0.001	0.022	0.399
	TLR4	1.18	1.27	1.37	0.82	1.48	0.419	0.810	0.256	0.973
	NF-κB	1.34	1.29	1.18	1.87	0.90	0.420	0.866	0.078	0.973
	MUC2	1.25	1.22	1.45	1.11	1.15	0.487	0.938	0.749	0.126
	IgA	2.25 ^x	1.21 ^y	1.57	2.00	1.61	0.366	0.002	0.441	0.291

¹ Η σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων στόχων υπολογίστηκε βάση της μέλετης του Pfaffl et al. (2001) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH.

² Χρησιμοποιούμενο είδος δημητριακού καρπού (ΔΚ): Αραβόσιτος (Α) ή Σιτάρι (Σ). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την επίδραση του είδους του ΔΚ αντιπροσωπεύουν τιμές από $n=15$ ορνίθια (π.χ. 5 από την επέμβαση Σ-0 + 5 από την επέμβαση Σ-100 + 5 από την επέμβαση Σ-150).

³ Τα επίπεδα προσθήκης του μίγματος φυτογενών συστατικών ΦΣ2 στο σιτηρέσιο (0 mg/kg, 100 mg/kg και 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για την επίδραση προσθήκης ΦΣ2 αντιπροσωπεύουν τις τιμές των μέσων από $n=10$ ορνίθια (π.χ. 5 από την επέμβαση from treatment Α-0 + 5 από την επέμβαση Σ-0).

⁴ Στην ίδια γραμμή τιμές διαφορετικό εκθέτη (x, y) για το είδος του δημητριακού καρπού και με εκθέτη (a, b) για τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2, διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$).

⁵ Τυπικό σφάλμα μέσων.

8.4 Συζήτηση – Σχολιασμός

Ο τύπος του βασικού σιτηρεσίου, έχει επισημανθεί σε πληθώρα μελετών ως ένας από τους κύριους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την εντερική υγεία και λειτουργία στα ορνίθια κρεοπαραγωγής (Brenes and Roura, 2010; Celi *et al.*, 2017; Ducatelle *et al.*, 2018). Πιο συγκεκριμένα, τα συστατικά του χορηγούμενου σιτηρεσίου έχει αναφερθεί ότι επιδρούν άμεσα ή έμμεσα επί παραγόντων οι οποίοι χαρακτηρίζουν την οικολογία του εντέρου όπως η σύνθεση των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας και επί παραγόντων που σχετίζονται άμεσα με την εντερική υγεία και ακεραιότητα (Choct, 2009; Suzuki and Hara, 2011; Lee *et al.*, 2017). Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό να παρέχει νέα δεδομένα και πιθανές εξηγήσεις σχετικές με τους μηχανισμούς που σχετίζονται με τα αποτελέσματα της δεύτερης και τρίτης μελέτης τα οποία αφορούσαν τις επιδράσεις των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 αλλά και του είδους του χρησιμοποιούμενου δημητριακού καρπού κατά περίπτωση, επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και στο κρέας. Πρέπει να σημειωθεί ότι κυρίως δόθηκε έμφαση, στις επιδράσεις των δύο προαναφερθέντων παραγόντων σε συνδυασμό, επί της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας και επί βιοδεικτών σχετιζόμενων με την εντερική υγεία και ακεραιότητα έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η ολοκληρωμένη και σε μεγαλύτερο βάθος διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους δρουν οι παράγοντες αυτοί.

Προσδιορίστηκαν στο εντερικό επιθήλιο και περιεχόμενο με τη βοήθεια της qPCR τα επίπεδα των πληθυσμών ορισμένων βακτηρίων τα οποία ήταν μέλη μερικών από τα πιο κυρίαρχα γένη του εντερικού οικοσυστήματος των ορνιθίων όπως αυτά των *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* και *Actinobacteria*, των οποίων τα μέλη είναι γνωστό ότι καταλαμβάνουν πάνω από το 90% των συνολικών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας (Lu *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2004). Από τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων για τα επίπεδα πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας προέκυψε ότι, το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού που χρησιμοποιήθηκε στην κατάρτιση του βασικού σιτηρεσίου παρουσίασε αλληλεπίδραση με τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 επηρεάζοντας τα επίπεδα των πληθυσμών των βακτηρίων *Bacteroides* spp και *Clostridium* cluster IV στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων. Πιο συγκεκριμένα, οι υψηλότερες τιμές για τα επίπεδα των πληθυσμών των

βακτηρίων *Bacteroides* spp παρατηρήθηκαν σε συγκέντρωση προσθήκης 150 mg ΦΣ2/ kg σιτηρεσίου στην επέμβαση (W150) στην οποία χορηγήθηκε σιτάρι ως κύριος δημητριακός καρπός (8.31) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για τις επεμβάσεις M150 (7.86) και W0 (7.79). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των πληθυσμών στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων των *Clostridium* cluster IV παρουσιάστηκαν σημαντικά υψηλότερα στις επεμβάσεις M0 (9.36) και M100 (9.31) συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές των επεμβάσεων W0 (8.44) και W100 (8.76) γεγονός που καταδεικνύει ότι για το συγκεκριμένο στέλεχος του γένους *Clostridia* η προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg ΦΣ2 / kg σιτηρεσίου έχει καλύτερα αποτελέσματα όταν ο χορηγούμενος δημητριακός καρπός στο σιτηρέσιο είναι ο αραβόσιτος. Είναι γνωστό ότι, η σύσταση του σιταριού διαφέρει από τον αραβόσιτο κυρίως λόγω των διαφορών στην περιεκτικότητα συγκεκριμένων υδατανθράκων όπως οι μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες (π.χ. αραβοξυλάνες, β-γλυκάνες). Η παρουσία αυτών των συστατικών στο σιτάρι έχει αναφερθεί ότι πιθανόν έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επιδράσεων επί των επιπέδων των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας αλλά και επί της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών του εντερικού συστήματος την παραγωγή δηλαδή πτητικών λιπαρών οξέων (Apajalahti *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2017).

Ανεξάρτητα από τα επίπεδα προσθήκης του ΦΣ2, το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού και πιο συγκεκριμένα το σιτάρι, επηρέασε σημαντικά την σύσταση των βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων, ελαττώνοντας τα επίπεδα των ολικών βακτηρίων καθώς επίσης και όλων των στελεχών του γένους *Clostridia* που μελετήθηκαν (*Clostridial* clusters I, IV and XIVa) συγκριτικά με τις αντίστοιχα επίπεδα πληθυσμών στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος ως δημητριακός καρπός. Επιπρόσθετα, στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ως δημητριακός καρπός σιτάρι, παρουσιάστηκε αύξηση των επιπέδων των πληθυσμών *Lactobacillus* spp., στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων καθώς επίσης και αύξηση στα επίπεδα των πληθυσμών του *Bifidobacterium* spp., στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων πάντα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα πληθυσμών στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ως βασικός δημητριακός καρπός ο αραβόσιτος. Τα παραπάνω αποτελέσματα δύναται να εξηγηθούν μέσω των επιδράσεων που είναι γνωστό ότι ασκεί το σιτάρι λόγω της προαναφερθείσας σύστασης του επί συγκεκριμένων πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας όπως

αυτά που ανήκουν στα γένη *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Enterobacteriaceae* (Kaldhusdal and Hofshagen, 1992; Choct *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2012).

Αναφορικά με την επίδραση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 και ανεξάρτητα από το είδος του δημητριακού καρπού που χορηγήθηκε στο βασικό σιτηρέσιο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση τους, επί των επιπέδων κανενός από τους μικροβιακούς πληθυσμούς των οποίων οι αντίστοιχες τιμές προσδιορίστηκαν με qPCR είτε στο επιθήλιο είτε στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών εντέρων. Παρόλα αυτά, η προσθήκη φυτοβιοτικών στα σιτηρέσια των ορνιθίων -όπως είδαμε και στο 2^ο κεφάλαιο- έχει αναφερθεί ότι προκαλεί ελάττωση παθογόνων βακτηρίων όπως *E. coli* (Cho *et al.*, 2014; Hashemipour *et al.*, 2016), *Salmonella* (Pathak *et al.*, 2016) και ενίσχυση της ανάπτυξης πληθυσμών ωφέλιμων βακτηρίων για το εντερικό σύστημα των ορνιθίων όπως οι *Lactobacillus* και τα *Bifidobacterium* (Mountzouris *et al.*, 2011; Franciosini *et al.*, 2015; Hashemipour *et al.*, 2016). Από την άλλη πλευρά σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί ότι δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές επιδράσεις της προσθήκης των φυτοβιοτικών επί της σύνθεσης των βακτηριακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας των ορνιθίων (Hong *et al.*, 2012; Pathak *et al.*, 2016), αναφορές οι οποίες έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Σημαντικοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο επιδρά η προσθήκη των φυτοβιοτικών επί της εντερικής μικροχλωρίδας των ορνιθίων μεταξύ άλλων, έχουν αναφερθεί ότι είναι η σύσταση των φυτοβιοτικών σε βιοενεργά συστατικά, τα επίπεδα προσθήκης τους, οι συνθήκες υγιεινής κατά την εκτροφή των ορνιθίων καθώς επίσης οι αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων. Η έλλειψη επιδράσεων της προσθήκης ΦΣ2 στην παρούσα μελέτη, μπορεί να εξηγηθεί ικανοποιητικά με έναν από τους παραπάνω προαναφερθέντες παράγοντες. Παρόλα η πιθανότητα ύπαρξης μεταβολών στην σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας εξαιτίας της προσθήκης του ΦΣ2 του πειράματος, είναι υπαρκτή καθώς είναι πιθανό αυτό να επιδρά σε κάποιον από τους πληθυσμούς βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας που δεν προσδιορίστηκαν καθώς επίσης η χρησιμοποίηση κάποιας άλλης αναλυτικής τεχνικής (π.χ. μικροβιακές καλλιέργειες) θα ήταν δυνατόν να δώσει κάποια άλλα πιθανά αποτελέσματα αναφορικά με την επίδραση του, στη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της δημοσίευσης των Paraskeuas and Mountzouris (2019a) στην οποία αναφέρεται ότι οι μεταβολές στη σύσταση της εντερικής

μικροχλωρίδας που παρατηρήθηκαν πιθανόν να συνδέονται με τις μεταβολές στις μοριακές αναλογίες των πτητικών λιπαρών οξέων (Π.Λ.Ο.) που προκλήθηκαν λόγω του τύπου του χορηγούμενου δημητριακού καρπού και της προσθήκης ΦΣ2 (Cao *et al.*, 2010). Παρόλα αυτά λόγω της χαμηλής επίδρασης της προσθήκης ΦΣ2 στην εντερική μικροχλωρίδα οι μεταβολές στις μοριακές αναλογίες και στις συγκεντρώσεις των Π.Λ.Ο. πιθανόν να εξαρτώνται περισσότερο από την ποσότητα και τον τύπο των συστατικών της τροφής όπως οι μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες που περιέχονται στο σιτάρι και φτάνουν στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων (Cummings and Macfarlane, 1991; Svihus *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, αναφορικά με τον τύπο του χορηγούμενου δημητριακού καρπού, τα σιτηρέσια με βασικό δημητριακό καρπό το σιτάρι είναι πιθανό να προκαλούν αύξηση των μοριακών αναλογιών του οξικού και του βουτυρικού οξέος στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων ενώ τα σιτηρέσια και βασικό δημητριακό καρπό τον αραβόσιτο δύναται να προκαλούν αντίστοιχες αυξήσεις των μοριακών αναλογιών του προπιονικού, του βαλερικού και του ισοβαλερικού οξέος (Kiarie *et al.*, 2014).

Στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των υποδοχέων TLR2 στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg / kg σιτηρεσίου. Μείωση της έκφρασης των υποδοχέων TLR ύστερα από προσθήκη φυτοβιοτικού σε σιτηρέσια ορνιθίων έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία (Lu *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016) και σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνεται η υπόθεση που εκτενώς αναλύθηκε στο 2^ο κεφάλαιο. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των φυτοβιοτικών που οδηγεί στην μείωση των επιπέδων έκφρασης των TLRs, είναι η πιθανή στόχευση τους ή άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στις οδούς μεταγωγής μηνυμάτων απευθείας από τα βιοενεργά συστατικά των φυτοβιοτικών (Lillehoj and Lee, 2012). Από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της έκφρασης των TLR σε ορνίθια στα οποία χορηγήθηκαν δημητριακοί καρποί εκτός αραβοσίτου ύστερα από επιμόλυνση με βακτήρια του γένους *Coccidial* (Chen *et al.*, 2015), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση πως άλλα είδη και γένη βακτηρίων συμμετέχουν στην ενεργοποίηση τους στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα.

Η διατήρηση της εντερικής ακεραιότητας είναι ζωτικής σημασίας για την εύρυθμη λειτουργία και τη διατήρηση της υγείας του εντερικού συστήματος (Suzuki and Hara,

2011; Du *et al.*, 2016). Πρωτεΐνες στενού συνδέσμου όπως η οκλουδίνη (OCLN), οι κλαουδίνες (CLDNs), και οι zonula (ZO) δρουν ως ένας φραγμός παρεμποδίζοντας και ρυθμίζοντας την παρακυτταρική διαπερατότητα (Hu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, και άλλες πρωτεΐνες του εντερικού συστήματος όπως οι βλεννοπρωτεΐνη MUC2 και η εκκριτική ανοσοσφαιρίνη A (sIgA) παρέχουν προστασία στο επιθηλιακό εντερικό κύτταρο από παθογόνους μικροοργανισμούς και άλλους κινδύνους που προκύπτουν στο εντερικό περιβάλλον (Tsirtsikos *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2016). Στην παρούσα μελέτη, από τον προσδιορισμό της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων προέκυψε μόνο μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους του χορηγούμενου δημητριακού καρπού και των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 για την έκφραση της ανοσοσφαιρίνης IgA στο επιθήλιο του ειλεού. Αναφορικά με τα υπόλοιπα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες τις σχετιζόμενες με τον εντερικό φραγμό, αυτά όπως θα δούμε και σε συσχέτιση με τα αποτελέσματα για τη σύνθεση των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας επηρεάστηκαν με έναν εξαιρετικά ενδιαφέρον τρόπο από το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού. Πιο συγκεκριμένα, έχοντας ως δεδομένο ότι τα επίπεδα των πληθυσμών των βακτηρίων παρουσιάστηκαν υψηλότερα στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος συγκριτικά με τα επίπεδα των ορνιθίων που χορηγήθηκε σιτάρι, είναι πιθανό ότι στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος τα μεγαλύτερα επίπεδα μικροβιακού φορτίου να προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων TLR2 καθώς επίσης και της IgA και της CLDN1 συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές έκφρασης στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι. Από την άλλη πλευρά, μια πιθανή εξήγηση για τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ZO-2 στο επιθήλιο του ειλεού στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές έκφρασης της ZO-2 στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος, μπορεί να σχετίζεται με τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα για το εντερικό περιβάλλον, όπως η αύξηση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου, που προκαλούνται λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σιταριού σε μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου όπως η ZO-2 για την αύξηση της προστασίας του εντερικού φραγμού (Hubener *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2017). Επιπρόσθετα, ανεξάρτητα από το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού, τα επίπεδα προσθήκης του ΦΣ2 προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης CLDN5 και της MUC2 στο επιθήλιο του ειλεού, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την εύρυθμη λειτουργία του εντερικού φραγμού, διότι όπως είναι

γνωστό, η ενίσχυση της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου έχει ως συνέπεια την ενίσχυση της ακεραιότητας του εντερικού (Suzuki and Hara, 2011; Zou *et al.*, 2016).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη παρείχε νέα δεδομένα σχετικά με την επίδραση του χορηγούμενου είδους καρπού και των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό επί της σύνθεσης των πληθυσμών των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας (π.χ. *Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp. και *Clostridia* Clusters I, IV και XIVa). Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη ΦΣ2 άσκησε ευεργετική επίδραση επί της έκφρασης γονιδίων κρίσιμων για τη λειτουργία του εντερικού φραγμού (π.χ. ZO-2, CLDN5 και MUC2) συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα TLR2 ο οποίος όπως προαναφέρθηκε αποτελεί ζωτικής σημασίας υποδοχέα για τη μεταγωγή μηνυμάτων εντός του κυττάρου τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσοβιολογικής απόκρισης (Keestra *et al.*, 2013).

Το μεγαλύτερο μέρος του πέμπτου πειράματος εμπεριέχεται στη δημοσίευση: Paraskeuas and Mountzouris 2019a (Παράρτημα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ήταν να διερευνήσει το ρόλο της προσθήκης φυτοβιοτικών σε σχέση με παραμέτρους του σιτηρεσίου κρεοπαραγωγών ορνιθίων επί των παραγωγικών τους αποδόσεων και σημαντικών βιοδεικτών της εντερικής τους λειτουργίας και υγείας. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν πειραματικά δύο τυποποιημένα φυτοβιοτικά ΦΣ1 και ΦΣ2 σε σιτηρέσια που διέφεραν είτε ως προς το επίπεδο ΜΕ και ΟΠ στην πρώτη περίπτωση, είτε ως προς το είδος του χρησιμοποιούμενου δημητριακού καρπού και το επίπεδο προσθήκης ΦΣ2 στη δεύτερη περίπτωση.

Το πρώτο φυτοβιοτικό (ΦΣ1) είχε ως κύρια συστατικά αιθέρια έλαια ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών. Η επίδραση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ1 στην διατροφή των ορνιθίων είχε διερευνηθεί σε προηγούμενες μελέτες (Mountzouris et al., 2011) με την πλειοψηφία των ευεργετικών αποτελεσμάτων επί των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων να συγκεντρώνεται στη συγκέντρωση των 125 mg ΦΣ1/kg σιτηρεσίου. Έτσι προέκυψε η ανάγκη μιας πιο ολοκληρωμένης και σε βάθος διερεύνησης για να εξεταστεί ο τρόπος αλλά και οι μηχανισμοί δράσης του ΦΣ1 στην βέλτιστη δοσολογία (125 mg ΦΣ1/kg σιτηρεσίου) οι οποίοι είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των ευεργετικών αυτών επιδράσεων. Οι επιδράσεις της προσθήκης ΦΣ1 επί των παραγωγικών αποδόσεων, των βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα και το κρέας, διερευνήθηκαν σε συνδυασμό με ελαττωμένα επίπεδα ενέργειας (ΜΕ) και πρωτεΐνης (ΟΠ) στο σιτηρέσιο και με διατήρηση του λόγου ΜΕ:ΟΠ σταθερού, (1^η μελέτη). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των επιδράσεων των δύο προαναφερθέντων εξεταζόμενων παραγόντων επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας και επιλεγμένων μοριακών βιοδεικτών της εντερικής υγείας και ακεραιότητας των ορνιθίων (4^η μελέτη) με σκοπό την πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε και η επίδραση ενός δεύτερου φυτοβιοτικού βασισμένου σε μενθόλη, ανηθόλη και ευγενόλη (ΦΣ2). Πρώτο στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα και

στο κρέας αλλά και επί μοριακών βιοδεικτών σχετιζόμενων με την υγεία του ορνιθίου, σε δύο διαφορετικές μελέτες με σιτηρέσια τα οποία διέφεραν στο είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού (αραβόσιτος στην 2^η μελέτη και σιτάρι στην 3^η μελέτη). Παρόλο που η δεύτερη και τρίτη μελέτη πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο χώρο ταυτόχρονα, με τις ίδιες συνθήκες εκτροφής, η επίδραση των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 διερευνήθηκε ξεχωριστά, διότι λόγω του διαφορετικού είδους του χορηγούμενου δημητριακού καρπού αλλά και της σύστασης του σιταριού (μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες) τα αποτελέσματα για τις παραγωγικές αποδόσεις δεν θα ήταν συγκρίσιμα. Τέλος στην 5^η μελέτη διερευνήθηκε σε βάθος η αλληλεπίδραση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 και του είδους του χορηγούμενου δημητριακού καρπού του σιτηρεσίου, επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας αλλά και επιλεγμένων μοριακών βιοδεικτών σχετιζόμενων με την εντερική υγεία και ακεραιότητα.

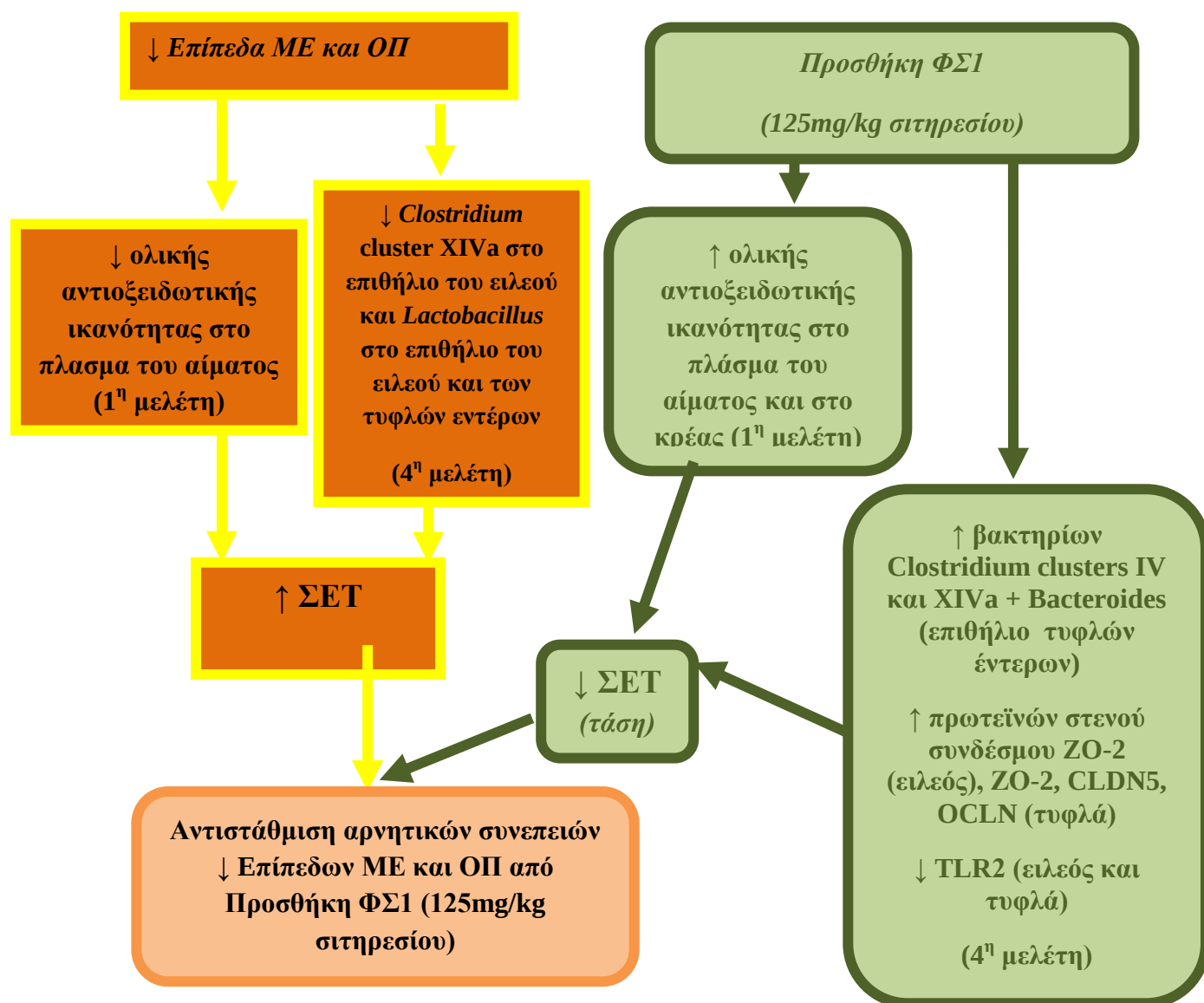
Στην πρώτη μελέτη, η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του ΣΕΤ των ορνιθίων. Επιπρόσθετα, η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ προκάλεσε μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος. Από την άλλη πλευρά η προσθήκη του ΦΣ1 στη χορηγούμενη δοσολογία (125 mg/kg), παρουσίασε τάση να αντισταθμίσει την αρνητική επίδραση της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ επί του ΣΕΤ των ορνιθίων, καθώς παρουσιάστηκε τάση για βελτίωση του. Παράλληλα η προσθήκη του ΦΣ1 προκάλεσε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς επίσης και μια ελάττωση στη συγκέντρωση χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος των ορνιθίων. Εν κατακλείδι από τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι αρνητικές συνέπειες της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ σχετιζόμενες με το ΣΕΤ και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα του αίματος, αντισταθμίστηκαν με την προσθήκη του ΦΣ1 και έδειξαν ότι το συγκεκριμένο φυτοβιοτικό μπορεί να αποτελέσει πιθανή επιλογή για την αντιμετώπιση των αρνητικών συνεπειών της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ με την προϋπόθεση διατήρησης του βέλτιστου ΜΕ προς ΟΠ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, δημιούργησαν νέα ερωτήματα σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης του ΦΣ1 αλλά και επιπτώσεων της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στον οργανισμό των ορνιθίων. Έτσι, η εκπόνηση της τέταρτης μελέτης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την πιο ολοκληρωμένη και σε βάθος ανάλυση

των αποτελεσμάτων της πρώτης. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι, ο τύπος του σιτηρεσίου και η προσθήκη ΦΣ1 επηρέασαν περισσότερο τα επίπεδα πληθυσμών των βακτηρίων στο εντερικό επιθήλιο από ότι αυτά στο περιεχόμενο του εντέρου. Συγκεκριμένα, οι κυριότερες επιδράσεις του τύπου του σιτηρεσίου εντοπίστηκαν κυρίως επί πληθυσμών βακτηρίων στο εντερικό επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων (ελάττωση των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων *Clostridium* cluster XIVa στο επιθήλιο του ειλεού και *Lactobacillus* στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων). Αντίθετα, οι επιδράσεις της προσθήκης ΦΣ1 εντοπίστηκαν κυρίως επί πληθυσμών βακτηρίων στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων (αύξηση των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων των γενών *Bacteroides* και *Clostridium* cluster IV και XIVa). Η αύξηση των εν λόγω συμπλεγμάτων του γένους *Clostridium* στο εντερικό επιθήλιο των τυφλών εντέρων, σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TRL2 και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου, αποτελούν τεκμήρια που υποστηρίζουν την θετική επίδραση της προσθήκης ΦΣ1 στο εντερικό περιβάλλον των ορνιθίων. Επιπρόσθετα, οι παραπάνω δείκτες εξηγούν και την δυνατότητα αντιστάθμισης των αρνητικών συνεπειών της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ του σιτηρεσίου των ορνιθίων επί των παραγωγικών αποδόσεων (αρνητική αύξηση ΣΕΤ) με την προσθήκη ΦΣ1. Συνοπτικά τα αποτελέσματα και η πορεία πραγματοποίησης της πρώτης και της τέταρτης μελέτης παρουσιάζονται στο **σχήμα 8**.

Παρόμοια τάση για βελτίωση του ΣΕΤ, με την παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε με αύξηση των επιπέδων προσθήκης μίγματος φυτογενών συστατικών (0, 60, 120 και 240 mg / kg σιτηρεσίου) βασισμένου σε θυμόλη (25%) και καρβακρόλη (25%) σε σιτηρέσια ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Du *et al.*, 2016). Στην μελέτη των Du *et al.* (2016) η παρουσίαση της τάσης για βελτίωση του ΣΕΤ αποδόθηκε μερικώς στην ελάττωση της έκφρασης στο εντερικό επιθήλιο και τα τυφλά έντερα του υποδοχέα TLR2 και της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν, με την αύξηση των επιπέδων προσθήκης του προαναφερθέντος φυτοβιοτικού, με άμεση συνέπεια τη βελτίωση της εντερικής υγείας των ορνιθίων που αποτελεί και έναν από τους κύριους παράγοντες βελτίωσης των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων. Παρόλα αυτά, στην παραπάνω μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές επιδράσεις των επιπέδων προσθήκης του φυτοβιοτικού επί της έκφρασης στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (OCLN, CLDN1). Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε αντίθεση με την παρούσα

μελέτη όπου φαίνεται το ΦΣ1 να επιδρά ευεργετικά πέραν της εντερικής υγείας (ελάττωση έκφρασης TLR2 σε επιθήλιο ειλεού και τυφλών εντέρων) και επί της εντερικής ακεραιότητας των ορνιθίων (αύξηση της έκφρασης των ZO-2, CLDN5 και OCLN).



Σχήμα 8. Συνοπτική παρουσίαση των κυριότερων αποτελεσμάτων της πρώτης και της τέταρτης μελέτης.

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να αναφερθεί ότι, το παραπάνω γεγονός σε συνδυασμό με την συνολική ευεργετική επίδραση του ΦΣ1 στην πρώτη και τέταρτη μελέτη, επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και της σύνθεσης των μικροβιακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, πιθανόν να

μπορεί να συνδεθεί και με την σύσταση του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου φυτοβιοτικού. Στο συμπέρασμα αυτό συνηγορεί το γεγονός ότι, στην προκειμένη περίπτωση πέραν της θυμόλης και καρβακρόλης που περιέχονταν στα αιθέρια έλαια της ρίγανης, το ΦΣ1 είχε επιπλέον ως κύρια συστατικά αιθέρια έλαια γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών, τα οποία πιθανόν να λειτούργησαν συνεργιστικά και να έδωσαν αποτελέσματα πιο έντονα από αυτά της μελέτης των Du *et al.* (2016).

Επιπρόσθετα, σε άλλα είδη ζώων όπως για παράδειγμα στη μελέτη των Zou *et al.* (2016), η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε σιτηρέσια χοίρων είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου OCLN και ZO-1 στο επιθήλιο της νήστιδας των χοίρων. Στην ίδια μελέτη σημειώνεται ότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει εργασία που να αναφέρεται στις επιδράσεις της προσθήκης φυτοβιοτικών επί της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού, αλλά παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που να αναφέρουν επιμέρους αποτελέσματα της προσθήκης φυτοβιοτικών επί της εντερικής ακεραιότητας σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια, χοίρους και ορνίθια κρεοπαραγωγής (Platcha *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2016). Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης των Wei *et al.* (2015) είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν στην πρώτη και τέταρτη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα στην παραπάνω μελέτη αναφέρεται ότι, η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης προκάλεσε ευεργετικές επιδράσεις επί της σύνθεσης των μικροβιακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας (αύξηση βακτηριακών πληθυσμών του γένους *Lactobacillus* και *Clostridium*), αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών στενού συνδέσμου όπως η OCLN στο επιθήλιο της νήστιδας και αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος.

Παρόλο που οι επιδράσεις των φυτοβιοτικών στη διατροφή των ορνιθίων έχουν μελετηθεί σε πλήθος εργασιών (Brenes and Roura, 2010; Gheisan and Kim, 2016) οι αλληλεπιδράσεις τους με την ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ στο σιτηρέσιο και ταυτόχρονη διατήρηση του λόγου ME προς ΟΠ σταθερού είναι πολύ περιορισμένες. Πιο συγκεκριμένα όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της εισαγωγής, έχει επισημανθεί έλλειψη δεδομένων στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τις επιδράσεις σιτηρεσίου με ελαττωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ενέργεια και σταθερό λόγο ME προς ΟΠ στην διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Kamran *et al.* 2008). Οι Kamran *et al.* (2008) πραγματοποίησαν μελέτη, στην οποία διερεύνησαν τις επιδράσεις σιτηρεσίων χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη με διατήρηση σταθερού του λόγου ενέργειας (ME) προς πρωτεΐνη (ΟΠ) επί των παραγωγικών

χαρακτηριστικών και της ποιότητας του σφαγίου των ορνιθίων. Στην παραπάνω μελέτη, διαπιστώθηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης του σιτηρεσίου σε συνδυασμό με τη διατήρηση σταθερού του λόγου ME προς ΟΠ, επηρέασαν δυσμενώς τις παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων χωρίς όμως να επηρεάσουν όμως την ποιότητα του σφαγίου. Από την άλλη πλευρά, στη μελέτη των Bravo et al. (2011) διερευνήθηκε σε δύο ξεχωριστά πειράματα η επίδραση επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών και της πεπτικότητας των ορνιθίων, ενός μίγματος αιθέριων ελαίων με κύρια συστατικά την καρβακρόλη, την κινναμαλδεύδη και την ελαιορητίνη το οποίο χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100 mg / kg της τροφής σε σιτηρέσια με δύο επίπεδα ME χωρίς όμως να διατηρηθεί σταθερός ο λόγος ενέργειας και πρωτεΐνης. Στην μελέτη αυτή διαπιστώθηκε, πως η χορήγηση του προαναφερθέντος μίγματος αιθέριων ελαίων αντιστάθμισε τις αρνητικές συνέπειες της ελάττωσης της ME του σιτηρεσίου κατά 2 % επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Συνολικά, από τα αποτελέσματα της πρώτης και τέταρτης μελέτης, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη ΦΣ1 παρουσίασε την τάση να αντισταθμίσει τις αρνητικές συνέπειες της ελάττωσης των επιπέδων ME και ΟΠ, με διατήρηση σταθερού του λόγου ME προς ΟΠ επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων. Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε ότι το ΦΣ1 ενίσχυσε την αντιοξειδωτική ικανότητα στο αίμα και στο κρέας των ορνιθίων καθώς επίσης παρουσίασε υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ΦΣ1 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των ωφέλιμων πληθυσμών βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας όπως αυτά του γένους *Clostridium*. Τέλος, η προσθήκη του ΦΣ1 είχε ευεργετική επίδραση επί της εντερικής ακεραιότητας ενισχύοντας την έκφραση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (ZO-2, OCLN και CLDN5), αλλά και επί της εντερικής υγείας ελαττώνοντας την έκφραση του υποδοχέα TLR2. Τα παραπάνω αποτελέσματα, αποτελούν νέα γνώση για τους μηχανισμούς επίδρασης των φυτοβιοτικών σε συνδυασμό με την ελάττωση των επιπέδων ME και ΟΠ, με διατήρηση σταθερού, του λόγου ME προς ΟΠ. Επιπρόσθετα, η προαναφερθείσα επίδραση των φυτοβιοτικών επί συγκεκριμένων οδών μεταγωγής μηνυμάτων (πρωτεΐνες στενού συνδέσμου, TLRs) μπορεί να προσδώσει νέες προοπτικές για την ενίσχυση της εντερικής φυσικής ανοσίας αλλά και την ελαχιστοποίηση των αρνητικών συνεπειών ασθενειών που σχετίζονται με μολύνσεις παθογόνων μικροοργανισμών στην ορνιθοτροφία.

Στη δεύτερη μελέτη, πραγματοποιήθηκε προσθήκη μίγματος φυτογενών συστατικών (ΦΣ2) σε συγκεντρώσεις 0, 100 και 150 mg ΦΣ2/ kg σιτηρεσίου, αραβόσιτου-σογιάλευρου. Κύριος σκοπός της μελέτης αυτής, ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των επιπέδων προσθήκης, του ΦΣ2, επί των παραγωγικών αποδόσεων, της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, των βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και στο κρέας αλλά και επί της έκφρασης μοριακών βιοδεικτών, η έκφραση των οποίων σχετίζεται με την εντερική (λεμφαδένες τυφλών εντέρων) και συστημική υγεία (σπλήνας) των ορνιθίων. Παρατηρήθηκε αύξηση του ΡΑΣΒ συνολικά για όλη τη διάρκεια του πειράματος με την προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150mg / kg, και βελτίωση του ΣΕΤ στη φάση πάχυνσης, όταν το ΦΣ2 χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 100mg / kg. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150mg / kg προκάλεσε αύξηση της πεπτικότητας της Ξ.Ο. και της AME_N. Τέλος, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος και μείωση της έκφρασης της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-18 στο σπλήνα. Παρόλα αυτά δεν διαπιστώθηκαν άλλες επιδράσεις των επιπέδων προσθήκης του ΦΣ2 επί της γονιδιακής έκφρασης των υπόλοιπων βιοδεικτών που προσδιορίστηκαν στο σπλήνα και στους λεμφαδένες των τυφλών εντέρων των ορνιθίων.

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ευεργετικές επιδράσεις της προσθήκης φυτοβιοτικών βασισμένων σε μενθόλη (Ocak *et al.*, 2008; Galib and Al-Kassie., 2010; Ameri *et al.*, 2016) ανηθόλη (Ciftci *et al.*, 2005; Galib and Al-Kassie., 2010; Kim *et al.*, 2013) και λιγότερες σε μίγματα αυτών (Hafeez *et al.*, 2015) επί των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Οι προαναφερθείσες επιδράσεις επί των παραγωγικών αποδόσεων αποδίδονται κυρίως στην ιδιότητα της μενθόλης και την ανηθόλης να επιδρούν ευεργετικά επί της πέψης των θρεπτικών συστατικών, και της δράσης των πεπτικών ενζύμων στο εντερικό σύστημα των ορνιθίων (Ocak *et al.*, 2008; Galib and Al-Kassie., 2010; Hafeez *et al.*, 2016), με το συνδυασμό ιδιαίτερα της ταυτόχρονης δράσης της μενθόλης, της ανηθόλης και της ευγενόλης να δίνει αποτελέσματα μεγαλύτερης έντασης επί της πεπτικότητας (Ciftci *et al.*, 2005) γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Επιπρόσθετα, σε αρκετές μελέτες η χορήγηση είτε μενθόλης, είτε ανηθόλης είτε και συνδυασμού τους στα σιτηρέσια των ορνιθίων έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της

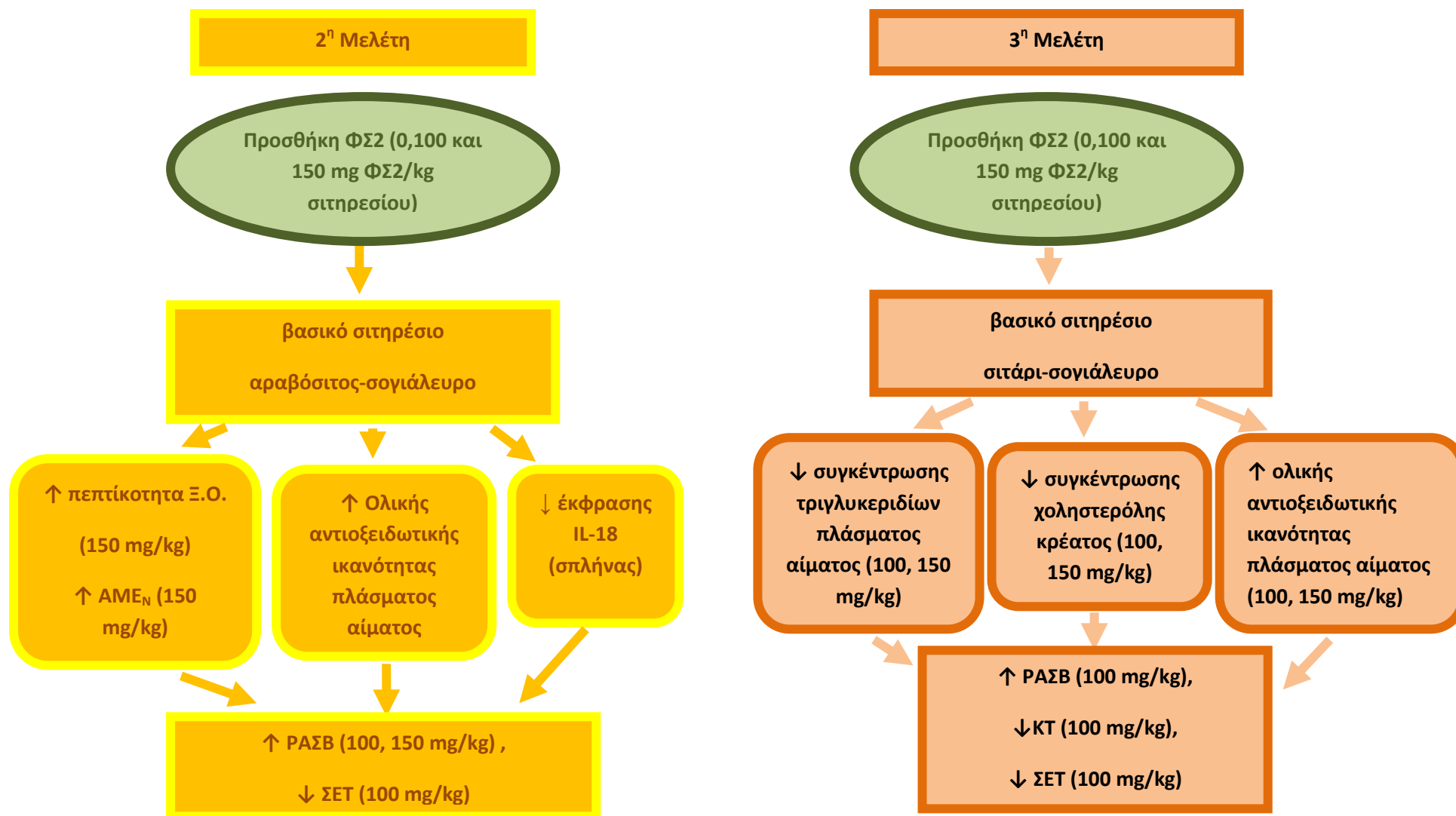
αντιοξειδωτικής δράσης στο πλάσμα του αίματος (Ameri *et al.*, 2016; Barakat *et al.*, 2016) και ενίσχυση της λειτουργίας του ανοσοβιολογικού συστήματος και γενικότερα της υγείας των ορνιθίων (Ameri *et al.*, 2016; Barakat *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013). Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών σε συνδυασμό με αυτά της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, η χορήγηση φυτοβιοτικών βασισμένων σε μενθόλη και ανηθόλη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στον οργανισμό των ορνιθίων λόγω της σύστασης τους και πιο συγκεκριμένα των φαινολικών συστατικών τους (Barakat *et al.*, 2016). Το γεγονός αυτό πιθανόν να συνδέεται και με την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και της υγείας των ορνιθίων (Ameri *et al.*, 2016) η οποία πέραν της βελτίωσης της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών πιθανόν να αποτελεί μια ακόμα εξήγηση για την βελτίωση των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων.

Στην τρίτη μελέτη, πραγματοποιήθηκε προσθήκη του ΦΣ2 σε συγκεντρώσεις ίδιες με αυτές της δεύτερης μελέτης (0, 100 και 150 mg/kg σιτηρεσίου) όμως αυτή τη φορά σε σιτηρέσια ορνιθίων βασισμένα σε σιτάρι και σογιάλευρο. Η προσθήκη του ΦΣ2 όταν αυτό χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 100 mg / kg είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ΡΑΣΒ στην τελική φάση πάχυνσης και συνολικά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ελάττωση της ΚΤ και βελτίωση του ΣΕΤ. Επιπρόσθετα, η αύξηση των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 προκάλεσαν ελάττωση της συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος και της συγκέντρωσης χοληστερόλης στο κρέας, ενώ παράλληλα προκάλεσαν αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος, με τα αποτελέσματα να εντοπίζονται και στις 2 συγκεντρώσεις προσθήκης (100 και 150 mg / kg). Τέλος, παρά την αυξητική επίδραση της προσθήκης του ΦΣ2 επί της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-2 στους λεμφοδένες των τυφλών εντέρων, τα αποτελέσματα επίδρασης των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 επί των εξεταζόμενων μοριακών βιοδεικτών ήταν περιορισμένα και περαιτέρω έρευνα κρίνεται ως αναγκαία για τη μελέτη των επιδράσεων του στην διατροφή και εντερική υγεία των ορνιθίων πιθανό ύστερα από επιμόλυνση με κάποιο παθογόνο παράγοντα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο φυτοβιοτικό (ΦΣ2) λόγω της σύστασης του επέδρασε ευεργετικά επί των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων, με τα περισσότερα αποτελέσματα να εντοπίζονται στη συγκέντρωση 100 mg/kg σιτηρεσίου. Επιπρόσθετα, οι προαναφερθείσες επιδράσεις του ΦΣ2 επί των βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα και στο κρέας αλλά και επί της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος, παρέχουν νέα στοιχεία για τις

ιδιότητες της σύστασης του συγκεκριμένου φυτοβιοτικού. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία, γιατί όπως αναφέρθηκε και στο 2^ο κεφάλαιο της εισαγωγής, οι ιδιότητες των φυτοβιοτικών παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας στη σύστασή τους, οπότε οι παραπάνω μελέτες παρέχουν νέα δεδομένα σχετικά με τις ιδιότητες φυτοβιοτικών που βασίζονται κυρίως σε μενθόλη και ανηθόλη.

Οι διαφορές μεταξύ των δύο μελετών (2^{ης} και 3^{ης}) πιθανόν να οφείλονται στη σύσταση των βασικών σιτηρεσίων καθώς στην 2^η μελέτη βασικός χορηγούμενος δημητριακός καρπός ήταν ο αραβόσιτος ενώ στην 3^η το σιτάρι. Είναι γνωστό ότι η υψηλή περιεκτικότητα του σιταριού σε μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες - κυρίως αραβινοξυλάνες - συγκριτικά με άλλους δημητριακούς καρπούς (Hew et al., 1998), έχει αναφερθεί ότι δημιουργούν δυσμενείς συνθήκες στο λεπτό έντερο αυξάνοντας σε μεγάλο βαθμό το ιξώδες του περιεχομένου του, επηρεάζοντας αρνητικά την πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, γεγονός που έχει ως άμεση συνέπεια να επηρεάζονται και τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής που το περιέχουν στο βασικό τους σιτηρέσιο (Annison and Choct, 1992; Rodriguez *et al.*, 2012). Οι παραπάνω συνέπειες οι οποίες δημιουργούνται κυρίως εξαιτίας της σύστασης του, αντιμετωπίζονται, με τη χορήγηση στο σιτηρέσιο των ορνιθίων ενζύμων, όπως οι γλυκανάσες (ξυλανάσες, β-γλυκανάσες) οι οποίες έχει αναφερθεί ότι βελτιώνουν την πεπτικότητα του αμύλου, της πρωτεΐνης, του λίπους και της φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας (AME) στα σιτηρέσια με βασικό συστατικό το σιτάρι ή ακόμα και κριθάρι μειώνοντας το ιξώδες του εντερικού περιεχομένου (Hew et al., 1998; Ravindran *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, στη παρούσα μελέτη στην οποία δεν χορηγήθηκαν ένζυμα η προσθήκη ΦΣ2 το οποίο ήταν βασισμένο σε μενθόλη και ανηθόλη βελτίωσε τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων και στην τελική φάση αλλά και καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Φυσικά το παραπάνω αποτέλεσμα δεν σημαίνει ότι τα φυτοβιοτικά με την παραπάνω σύσταση δύναται να αντικαταστήσουν τα ένζυμα που χορηγούνται σε ορνίθια στα οποία το βασικό σιτηρέσιο έχει ως κύριο δημητριακό καρπό το σιτάρι, αλλά δείχνει ότι ίσως ένας συνδυασμός στη χορήγηση τους, εφόσον είναι οικονομικά αποδεκτός, να παρουσιάζει ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Πράγματι, συνδυασμένη χορήγηση φυτοβιοτικών με ένζυμα όπως οι ξυλανάσες έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα από ότι η μεμονωμένη χορήγηση τους, αυξάνοντας την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, βελτιώνοντας το μεταβολισμό των λιπιδίων,

επιδρώντας ευεργετικά επί βιοδεικτών που σχετίζονται με την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος με άμεση συνέπεια αυτό να μεταφράζεται και σε βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων (Malayoglu *et al.*, 2010; Amerah *et al.*, 2011). Στη μελέτη των Malayoglu *et al.* (2010) αναφέρεται ότι οι τρόποι δράσης ενζύμων και φυτοβιοτικών εμφανίστηκαν κατά τη μεμονωμένη χορήγηση τους, διαφορετικοί. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα παρουσίασαν την ικανότητα να προκαλούν βελτίωση του το ιξώδους του εντερικού περιεχόμενου και της πεπτικότητας των λιπών και τα φυτοβιοτικά να προκαλούν αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της πεπτικότητας της πρωτεΐνης, ενώ συνδυασμένη δράση τους ήταν πιο αποτελεσματική στη βελτίωση όλων των εξεταζόμενων παραμέτρων (παραγωγικά χαρακτηριστικά, πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών, ενεργότητα ενζύμων, ανοσοποιητικό σύστημα). Στο **Σχήμα 9**, παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της δεύτερης και τρίτης μελέτης.



Σχήμα 9. Συνοπτική απεικόνιση αποτελεσμάτων δεύτερης και τρίτης μελέτης.

Επιπρόσθετα, όπως είδαμε και στο πρώτο κεφάλαιο, το σιτάρι λόγω της σύστασης του επιδρά επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας και πιο συγκεκριμένα ευνοεί την αύξηση πληθυσμών των γενών *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Enterobacteriaceae* (Kaldhusdal and Hofshagen, 1992; Choct *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2012). Το γεγονός αυτό, αποδίδεται στους μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες του σιταριού οι οποίοι αυξάνουν το χρόνο παραμονής του περιεχομένου στο έντερο, αλληλεπιδρούν με τους μουκοπολυσακχαρίτες του επιθηλίου, με άμεσο αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολλών γενών αναερόβιων βακτηρίων (Choct *et al.*, 1996). Επιπλέον, επιδράσεις των μη αμυλώδων πολυσακχαριτών του σιταριού, έχουν αναφερθεί στη μελέτη των Chen *et al.* (2016) στην οποία η χρησιμοποίηση σιταριού στο βασικό σιτηρέσιο είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της έκφρασης προφλεγμονώδων κυτταροκινών και η ελάττωση της έκφρασης πρωτεϊνών στενού συνδέσμου όπως η οκλουδίνη (OCLN) αλλά και της βλεννοπρωτεΐνης 2 (MUC2), στο επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε σύγκριση με αντίστοιχες τιμές σε ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε βασικό σιτηρέσιο με κύριο δημητριακό καρπό τον αραβόσιτο.

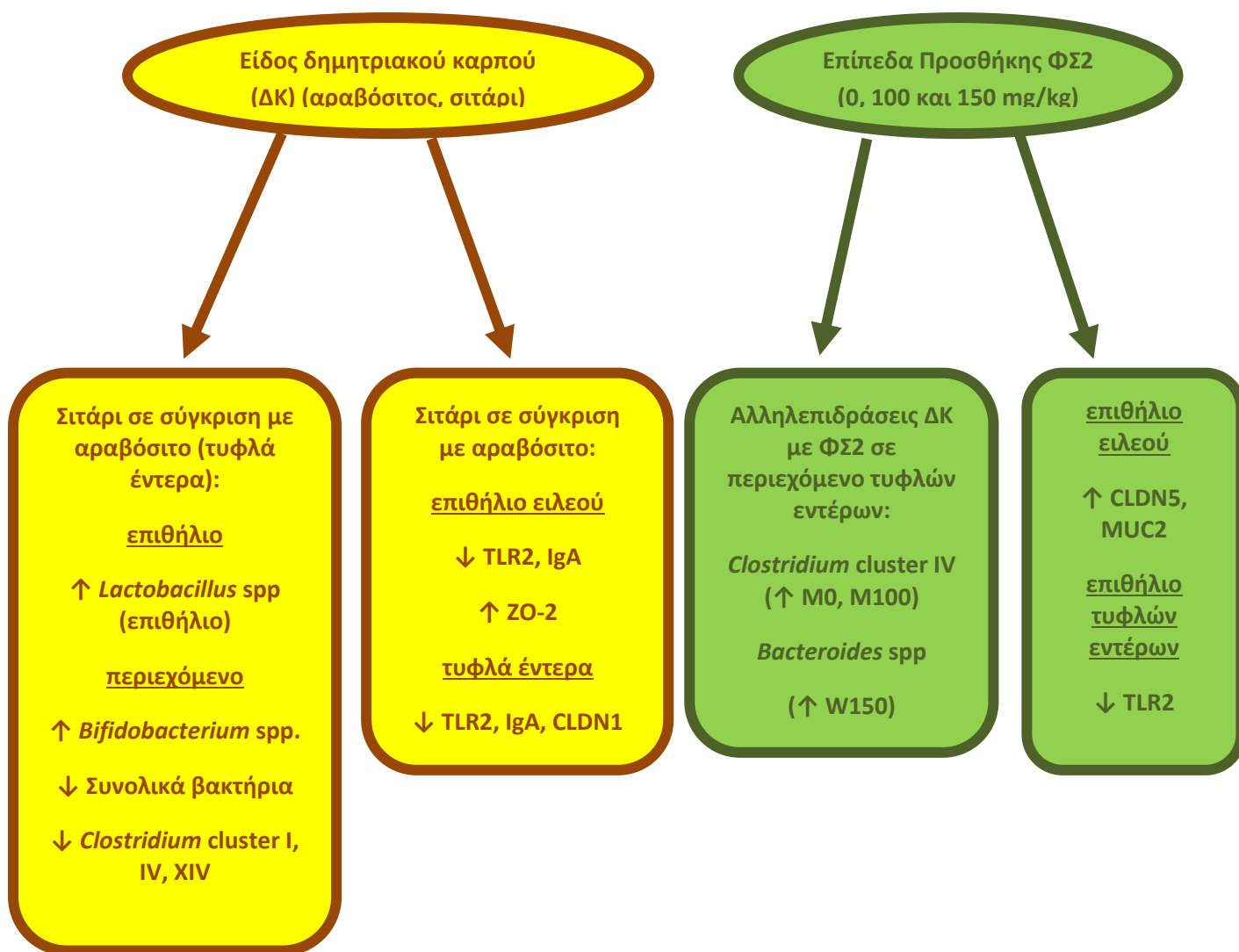
Για τους παραπάνω λόγους η πέμπτη μελέτη, πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση των επιδράσεων των επιπέδων προσθήκης ΦΣ2 σε συνδυασμό με το είδος του χορηγούμενου δημητριακού καρπού επί παραμέτρων όπως η σύνθεση των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, και επί μοριακών βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική υγεία και ακεραιότητα. Πιο συγκεκριμένα διερευνήθηκαν οι επιδράσεις του τύπου του χορηγούμενου στο βασικό σιτηρέσιο δημητριακού καρπού (αραβόσιτος, σιτάρι) σε συνδυασμό με τα επίπεδα προσθήκης του ΦΣ2, επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, και της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την εντερική υγεία και ακεραιότητα όπως οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου (ZO-1, ZO-2, CLDN1, CLDN5 και OCLN), οι υποδοχείς Toll-like (TLR), η βλεννοπρωτεΐνη 2 (MUC2) και η ανοσοσφαιρίνη Α (IgA) στο επιθήλιο του ειλεού και των τυφλών εντέρων.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της πέμπτης μελέτης, τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* spp. στο επιθήλιο του τυφλού εντέρου. Επιπρόσθετα, στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο εξεταζόμενων παραγόντων για τα βακτήρια του είδους *Clostridial* cluster IV με την προσθήκη ΦΣ2 σε συγκέντρωση 100 mg / kg να παρουσιάζει

καλύτερα αποτελέσματα όταν ο χορηγούμενος δημητριακός καρπός στο σιτηρέσιο των ορνιθίων ήταν ο αραβόσιτος. Επιπλέον, στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι, παρατηρήθηκε ελάττωση στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων των επιπέδων των ολικών βακτηρίων καθώς επίσης και όλων των στελεχών του γένους *Clostridium* που μελετήθηκαν (*Clostridial* clusters I, IV and XIVa) συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα πληθυσμών στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος. Οι παραπάνω μεταβολές αποδόθηκαν στη διαφορετική περιεκτικότητα συγκεκριμένων υδατανθράκων όπως οι μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες (π.χ. αραβοξυλάνες, β-γλυκάνες) στο σιτάρι σε σύγκριση με τον αραβόσιτο, η παρουσία των οποίων έχει αναφερθεί ότι ασκεί αρνητική επίδραση επί πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας αλλά και επί της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (Apajalahti *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2017). Τέλος, στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα των πληθυσμών του *Bifidobacterium* spp., στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων, μεταβολή η οποία μαζί με την αύξηση των επιπέδων των πληθυσμών *Lactobacillus* spp., στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων, πιθανόν και αυτή να σχετίζεται με τη σύσταση του σιταριού και την επίδραση που αυτή ασκεί όπως προαναφέρθηκε επί πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας όπως τα *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Enterobacteriaceae* (Kaldhusdal and Hofshagen, 1992; Choct *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2012). Η απουσία σημαντικών επιδράσεων της προσθήκης ΦΣ2 επί της σύνθεσης των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας πιθανόν να αποδίδεται, όπως προαναφέρθηκε στο σχολιασμό της πέμπτης μελέτης στη σύσταση του χορηγηθέντος φυτοβιοτικού σε βιοενεργά συστατικά, στις άριστες συνθήκες υγιεινής κατά την εκτροφή των ορνιθίων και πιθανόν και στις αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού των επιπέδων των πληθυσμών των βακτηρίων.

Στην πέμπτη μελέτη, η προσθήκη ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των υποδοχέων TLR2 στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε ΦΣ2 σε συγκέντρωση 150 mg/kg. Μείωση της έκφρασης των υποδοχέων TLR ύστερα από προσθήκη φυτοβιοτικού σε σιτηρέσια ορνιθίων έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία (Lu *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016) και σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα της τέταρτης μελέτης επιβεβαιώνεται η υπόθεση που αναφέρθηκε στο δεύτερο κεφάλαιο (**Σχήμα 4**) για τον πιθανό μηχανισμό δράσης των φυτοβιοτικών και την πιθανή απευθείας στόχευση των TLRs από τα βιοενεργά συστατικά των φυτοβιοτικών (Lillehoj and Lee, 2012).

Τέλος, η χρησιμοποίηση σιταριού προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης της ZO-2 στο επιθήλιο του ειλεού και σημαντική ελάττωση της έκφρασης του TLR2 και της IgA στο επιθήλιο και του ειλεού και των τυφλών εντέρων συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές για τα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος. Οι επιδράσεις αυτές του είδους του χορηγούμενου καρπού αποδόθηκαν στα υψηλότερα επίπεδα πληθυσμών των βακτηρίων στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε αραβόσιτος συγκριτικά με αυτά στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι, διότι είναι πιθανόν τα μεγαλύτερα επίπεδα μικροβιακού φορτίου να προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων TLR2 καθώς επίσης και της IgA και της CLDN1 συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές έκφρασης στα ορνίθια στα οποία χορηγήθηκε σιτάρι. Επίσης, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ZO-2 λόγω της χορήγησης σιταριού πιθανόν μπορεί να εξηγούνται από τα προαναφερθέντα ανεπιθύμητα αποτελέσματα για το εντερικό περιβάλλον που προκαλούνται λόγω της σύστασης του (Hubener *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2017). Τα επίπεδα προσθήκης ΦΣ2 προκάλεσαν αύξηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της CLDN5 και της MUC2 στο επιθήλιο του ειλεού συγκριτικά με τις επεμβάσεις στις οποίες δε χορήγηθηκε το ΦΣ2, αποτελέσματα τα οποία σε συνδυασμό με εκείνα του τέταρτου πειράματος ταυτίζονται με τις υποθέσεις που παρατέθηκαν στο 2^ο κεφάλαιο (**Σχήμα 6**) ενισχύοντας την άποψη ότι η χορήγηση φυτοβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της εύρυθμης λειτουργίας του εντερικού φραγμού, μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (Suzuki and Hara, 2011; Zou *et al.*, 2016). Συνοπτικά τα αποτελέσματα της πέμπτης μελέτης παρουσιάζονται στο **Σχήμα 10**.



Σχήμα 10. Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων πέμπτης μελέτης.

Συμπερασματικά, από την πέμπτη μελέτη, προέκυψε νέα γνώση σχετικά με την επίδραση του χορηγούμενου είδους δημητριακού καρπού και των επιπέδων προσθήκης του συγκεκριμένου φυτοβιοτικού (ΦΣ2) επί της σύνθεσης των πληθυσμών των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας (π.χ. *Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp. και *Clostridia* clusters I, IV and XIVa). Επιπρόσθετα, σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα της τέταρτης μελέτης επιβεβαιώθηκε η υπόθεση του 2^{ου} κεφαλαίου της εισαγωγής, πως η προσθήκη φυτοβιοτικών σε σιτηρέσια ορνιθίων έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων κρίσιμων για τη λειτουργία του εντερικού φραγμού όπως είναι οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου. Επιπρόσθετα, και στις 2 μελέτες (4^η και 5^η μελέτη) προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα

φυτοβιοτικά ασκούν ευεργετική επίδραση επί της εντερικής υγείας μέσω της απευθείας στόχευσης και μείωση της έκφρασης των υποδοχέων TLR.

Συνολικά, η προσθήκη των δύο φυτοβιοτικών ΦΣ1 και ΦΣ2 στα σιτηρέσια επέδρασε ευεργετικά επί των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής είτε βελτιώνοντας σημαντικά (2^η και 3^η μελέτη) είτε παρουσιάζοντας τάση (1^η μελέτη) για βελτίωση του ΣΕΤ, επιβεβαιώνοντας το ρόλο τους ως αυξητικών παραγόντων στην διατροφή των ορνιθίων. Στην περίπτωση του ΦΣ1 στην 1^η μελέτη, η τάση για ευεργετική επίδραση επί του ΣΕΤ πιθανόν να οφείλεται στην ευεργετική επίδραση του επί της εντερικής μικροχλωρίδας, στην ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την εντερική ακεραιότητα και υγεία (4^η μελέτη). Από την άλλη πλευρά η ευεργετική επίδραση του ΦΣ2 επί των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων πιθανόν να οφείλεται στην βελτίωση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών (2^η μελέτη) και στην ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την εντερική ακεραιότητα και υγεία (5^η μελέτη).

Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε ο ρόλος των συγκεκριμένων φυτοβιοτικών ως αντιοξειδωτικών παραγόντων καθώς η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα είτε στο αίμα και στο κρέας (1^η μελέτη) είτε μόνο στο πλάσμα του αίματός (2^η και 3^η μελέτη) αυξήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Όπως έχει αναφερθεί τα φυτοβιοτικά προκαλούν ελάττωση της συγκέντρωσης χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος αλλά και στο κρέας των ορνιθίων λόγω της παρεμπόδισης του ενζύμου HMG-Co A αναγωγάσης το οποίο συνδέεται με την σύνθεση χοληστερόλης σε αρκετά είδη ζώων (Ciftci et al., 2010; El-Ghousein *et al.*, 2009; Hayati *et al.*, 2011). Επιπλέον, στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιβεβαιώθηκαν και οι υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες των συγκεκριμένων φυτοβιοτικών χοληστερόλης είτε στο πλάσμα του αίματος (1^η μελέτη) είτε στο κρέας (3^η μελέτη) των ορνιθίων. Οι επιδράσεις των ΦΣ1 και ΦΣ2 σε όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους στις μελέτες που εκπονήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρουσιάζονται συνοπτικά στον **πίνακα 9.1**.

Πίνακας 9.1. Συνοπτική παρουσίαση της επίδρασης των χρησιμοποιούμενων φυτοβιοτικών, στους κυριότερους βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή

	1 ^η Μελέτη	2 ^η Μελέτη	3 ^η Μελέτη	4 ^η Μελέτη	5 ^η Μελέτη
Φυτοβιοτικό	ΦΣ1 ¹	ΦΣ2 ²	ΦΣ2	ΦΣ1	ΦΣ2
Παραγωγικά Χαρακτηριστικά	↓ ΣΕΤ (τάση)	↑ ΡΑΣΒ ↓ ΣΕΤ	↑ ΡΑΣΒ ↓ ΚΤ, ΣΕΤ		
Πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών	Κ.Δ. ³	↑ (Ξ.Ο., ΑΜΕ _N)	Κ.Δ.		
Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα	↑.(αίμα+κρέας)	↑.(αίμα)	↑.(αίμα)		
Συγκέντρωση Χοληστερόλης	↓(αίμα)	Δ.Μ.	↓ (κρέας)		
Εντερική Μικροχλωρίδα				↑ (<i>Clostridium</i> clusters IV, XIV)	↑ (<i>Clostridium</i> cluster IV, <i>Bacteroides</i>)
Εντερική ακεραιότητα				↑ (CLDN5, ZO2, OCLN)	↑ (CLDN5, MUC2)
Εντερική Υγεία				↓TLR2	↓TLR2

¹ ΦΣ1: φυτοβιοτικό με κύρια συστατικά αιθέρια έλαια ρίγανης, γλυκάνισου και φλοιού εσπεριδοειδών.

² ΦΣ2: φυτοβιοτικό βασισμένο σε μενθόλη και ανηθόλη

³ Κ.Δ.:Καμία σημαντική διαφορά

Τα φυτοβιοτικά ΦΣ1 και ΦΣ2 επιβεβαίωσαν τις υποθέσεις του δευτέρου κεφαλαίου πως, η προσθήκη φυτοβιοτικών ενισχύει την έκφραση πρωτεϊνών στενού συνδέσμου όπως οι ZO-2, OCLN, CLDN5 στο εντερικό επιθήλιο με άμεση συνέπεια τη δημιουργία προϋποθέσεων για ενίσχυση της εντερικής ακεραιότητας στο επιθήλιο των ορνιθίων. Επιπρόσθετα και η προσθήκη των ΦΣ1 και ΦΣ2 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της εντερικής υγείας μέσω της ελάττωσης της έκφρασης των υποδοχέων TLR και πιο συγκεκριμένα των TLR2 στο εντερικό επιθήλιο οι οποίοι

όπως προαναφέρθηκε είναι κρίσιμοι λόγω μεταξύ άλλων της συμμετοχής τους στην οδό μεταγωγής μηνυμάτων NF-κΒ, η οποία σχετίζεται με την ρύθμιση της φλεγμονώδη απόκρισης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την 1^η και την 4^η μελέτη στις οποίες όπως προαναφέρθηκε διερευνήθηκε η συνδυασμένη ή μη επίδραση της προσθήκης φυτοβιοτικού με την ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ με σταθερό λόγο ΜΕ:ΟΠ, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον από άποψης παροχής νέας γνώσης στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Αυτό συμβαίνει διότι, με εξαίρεση τη μελέτη των Bravo et al. (2011) στην οποία μελετήθηκε η προσθήκη φυτοβιοτικού σε συνδυασμό με διαφορετικά επίπεδα ενέργειας στο σιτηρέσιο χωρίς όμως τη διατήρηση του λόγου ΜΕ προς ΟΠ σταθερού, δεν εντοπίστηκαν παρόμοιες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία. Επιπρόσθετα, στη μελέτη των Kamran et al. (2008) επισημαίνεται η έλλειψη μελετών που να πραγματοποιούν διερεύνηση της επίδρασης του σταθερού λόγου ΜΕ προς ΟΠ στη διατροφή των ορνιθίων όταν σε αυτά χορηγούνται σιτηρέσια με χαμηλή περιεκτικότητα σε ΜΕ και ΟΠ.

Τέλος, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής ανοίγουν νέους δρόμους σχετικά με τη μελέτη των μηχανισμών δράσης των φυτοβιοτικών σε μοριακό επίπεδο. Ο προσδιορισμός μέσω μοριακών τεχνικών πρωτεϊνών, ενζύμων και γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση τους δύναται να παρέχει νέες εξηγήσεις σχετικά με την ισχυρή αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Επιπρόσθετα, η χρήση των αποτελεσμάτων της επίδρασης των συγκεκριμένων φυτοβιοτικών επί γονιδίων που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και υγεία δίνει το έναυσμα να διερευνηθούν γονίδια που συμμετέχουν στις οδούς μεταγωγής μηνυμάτων στις οποίες εμπλέκονται γονίδια όπως οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου και οι υποδοχείς TLR.

Βιβλιογραφία

Διεθνής

- Abou-Elkhair, R., Ahmed, H. A., and Selim, S. 2014. Effects of Black pepper (*Piper Nigrum*), Turmeric Powder (*Curcuma Longa*) and Coriander Seeds (*Coriandrum Sativum*) and their combinations as feed additives on growth performance, carcass traits, some blood parameters and humoral immune response of broiler chickens. J. Anim. Sci. 27:847-854.
- Akbari, M., and Torki, M. 2014. Effects of dietary chromium picolinate and peppermint oil on growth performance and blood biochemical parameters of broiler chicks reared under heat stress conditions. Int. J. Biometeorol. 58:1383–1391.
- Akbarian, A., A. Golian, H. Kermanshahi, R. Farhoosh, A. R. Raji, S. De Smet, and J. Michiels. 2013. Growth performance and gut health parameters of finishing broilers supplemented with plant extracts and exposed to daily increased temperature. Span. J. Agric. Res. 11:109-119.
- Akbarian, A., Michiels, J., Golian, A., Buyse J., Wang, Y., and De Smet, S. 2014. Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. Poult. Sci. 93 :1930–1941.
- Akyurek, H. and Yel, A. 2011. Influence of dietary thymol and carvacrol preparation and/or an organic acid blend on growth performance, digestive organs and intestinal microbiota of broiler chickens. Afr. J. Microbiol. Res. 5: 979- 984.
- Aletor VA, Hamid II, Nieb E and Pfeffer E. 2000. Low-protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: effects on performance, carcass characteristics, whole-body composition and efficiencies of nutrient utilisation. J. Sci. Food Agric. 80: 547-554.
- Al-Jaff, F. K. 2011. Effect of coriander seeds as diet ingredient on blood parameters of broiler chicks raised under high ambient temperature. Int. J. Poult. Sci. 10: 82-86.
- Amad, A. A., Manner, K., Wendler, K. R., Neumann, K. and Zentek, J. 2011. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. Poult. Sci. 90: 2811-2816.

- Alzawqari, M. H., Al-Baddany A. A., Al-Baadani, H. H., Alhidary, I., Rifat Ullah Khan, A., Aqil, G. M., and Abdurab, A. 2016. Effect of feeding dried sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) leaves on growth performance, carcass traits, serum metabolites and antioxidant status in broiler during the finisher phase Environ. Sci. Pollut. Res. 23:17077–17082.
- Amad, A. A., Manne,r K.,Wendler, K. R., Neumann, K. and Zentek, J. 2011. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. Poult. Sci. 90:2811-16.
- Amerah, A. M., Peron, A., Zaefarian, F., and Ravindran, V. 2011. Influence of whole wheat inclusion and a blend of essential oils on the performance, nutrient utilisation, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. Br. Poult. Sci.:52:124-132.
- Ameri S. A., Samadi, F., Dastar, B. and Zerehdaran, S. 2016. Effect of Peppermint (*Mentha piperita*) powder on immune response of broiler chickens in heat stress. Iran. J. Appl. Anim. Sci. 6: 435-445.
- Ani, A. O., Iloh, E. A. and Akinsola, O. O. 2015. Dietary effect of processed orange peels on growth performance of broiler finisher birds. Br. J. Appl. Sci. Technol. 9:576-583.
- Annison, G. and Choct, M., 1992. The inhibition of nutrient digestion by wheat pentosans. Br. J. Nutr. 67:123-132.
- AOAC. 1984. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 14th edn. Official Methods Analysis: Arlington, VA.
- AOAC. 1984. ‘Association of Official Analytical Chemists (AOAC).’ 14th edn.
- AOAC. 1991. Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Official Methods of Analysis. Arlington, VA. USA.
- Apajalahti, J., A. Kettunen, and H. Graham. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. Worlds Poult. Sci. 60:223-232.
- Aura, A.M., K. A. O’Leary, G. Williamson, M. Ojala, M. Bailey, R. Puuoponen-Pimia, A. M. Nuutila, K.M. Oksman-Caldentey, and K. Poutanen. 2002. Quercetin Derivatives Are Deconjugated and Converted to Hydroxyphenylacetic Acids but Not Methylated by Human Fecal Flora in Vitro. J. Agric. Food Chem. 50:1725-1730.

- Avila-Ramos, F., Pro-Martinez, A., Sosa-Montes, E., Cuca-Garcia, J. M., Becerril-Perez, C. M., Figueroa-Velasco J. L., and C. Narciso-Gaytan. 2012. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. *Poult. Sci.* 91:505–511.
- Awad, W. A., E. Mann, M. Dzieciol, C. Hess, S. Schmitz-Esser, M. Wagner, and M. Hess. 2016. Age-related differences in the luminal and mucosa associated gut microbiome of broiler chickens and shifts associated with *Campylobacter jejuni* infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:1-17.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol.* 46: 446–475.
- Barakat, D. M., El-Far, A. H., Sadek, K. M., Mahrous, U. E., Ellakany, H. F., Abdel-Latif, M. A. 2016. Anise (*Pimpinella anisum*) enhances the growth performance, immunity and antioxidant activities in broilers. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 37: 134-140.
- Barreto, M. S. R, Menten, J. F. M., Racanicci, A. M. C., Pereira, P. W. Z. and Rizzo. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Braz. J. Poultry. Sci.* 10: 109-115.
- Baser, K. H. C., and Demirci, F. 2007. Chemistry of Essential Oils. In: *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, edited by Berger RG. New York: Springer. p. 43–86.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2001. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.
- Bayer, A. L., Yu, A. and Malek, T. R. 2007. Function of IL-2R for thymic and peripheral CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ regulatory cells. *J. Immunol.* 1:4062-4071.
- Berres, J., Vieira, S. L., Dozier, W. A., Cortes, M. E. M., Barros, R., Nogueira, E. T. and Kutschenko, M. 2010. Broiler responses to reduced-protein diets supplemented with valine, isoleucine, glycine, and glutamic acid. *J. Appl. Poult. Res.* 19: 68-79.
- Boroojeni, F. G., W. Vahjen. A. Mader, F. Knorr, I. Ruhnke, I. Rohe, A. Hafeez, C. Villodre, K. Manner, and J. Zentek. 2014. The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poult. Sci.* 93:1440-1452.

- Botsoglou, N. A., Florou Paneri, P., Christaki, E., Fletouris, D. J. and Spais, A. B. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Sci.* 62: 259-265. 2002.
- Botsoglou, N.A., Christaki, E., Florou-Paneri, P., Giannenas, I. Papageorgiou, G. and Spais, A.B. 2004. The effect of a mixture of herbal essential oils or α -tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34: 52-60.
- Bradford, M. M. A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bravo, D., Utterback, P. and Parsons, C. M. 2011. Evaluation of a mixture of carvacrol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin for improving growth performance and metabolizable energy in broiler chicks fed corn and soybean meal. *J. Appl. Poult. Res.* 20: 115-120.
- Bravo, D., Pirgozliev, V. and Rose S. P. 2014. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *J. Anim. Sci.* 2014.92:1531carva
- Brenes, A., and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 158:1-14.
- Bregendahl, K., Sell, J. L. and Zimmerman, D. R. 2002. Effect of low-protein diets on growth performance and body composition of broiler chicks. *Poult. Sci.* 81: 1156-1167.
- Brenes, A. and Roura, E. 2010. Essential oils in broiler nutrition: Main effects and modes of action. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 158: 1-14.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 223– 253.
- Cao, G. and Prior, R. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* 299: 50-62.
- Cao, P. H., F.D. Li, Y.F. Li, Y.J. Ru, A. Péron, H. Schulze, and H. Bento. 2010. Effect of Essential Oils and Feed Enzymes on Performance and Nutrient Utilization in Broilers Fed a Corn/Soy-based Diet. *Int. J. Poult. Sci.* 9: 749-755.

- Celi, P., Cowieson, A. J., Fru-Nji, F., Steinert, R. E., Klünter, A. M., and Verlhac, V. 2017. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 234:88-100.
- Chen J, Tellez G, Richards JD, Escobar J. 2015. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Front Vet Sci.* 2:2-10.
- Cho, J.H., H.J. Kim, I.H. Kim. 2014. Effects of phytogenic feed additive on growth performance, digestibility, blood metabolites, intestinal microbiota, meat color and relative organ weight after oral challenge with *Clostridium perfringens* in broilers. *Livest. Sci.* 160:82-88.
- Choct M, Hughes RJ, Wang J, Bedford MR, Morgan AJ, Annison G. 1996. Increased small intestine fermentation is partly responsible for the antinutritive activity on non-starch polysaccharides in chickens. *Br. Poult. Sci.* 37:609-621.
- Choct, M. 2009. Managing gut health through nutrition. *Br. Poult. Sci.* 50:9-15.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I.N, and M.G. Kontominas, M. G. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4⁰ C. *Food Microbiol.* 24: 607–617.
- Ciftci, M., Góler, T., Dalkilic, B. and Ertas. N. O. 2005. The effect of anise oil (*Pimpinella anisum L.*) on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 851-855.
- Ciftci, M., Simsek, U. G., Yuce, A., Yilmaz, O. and Dalkilic, B. 2010. Effects of dietary antibiotic and cinnamon oil supplementation on antioxidant enzyme activities, cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and meat in broiler chickens. *Acta. Vet. Brno.* 79: 33-40.
- Clifford, R. J., M. Milillo, J. Prestwood, R. Quintero, D. V. Zurawski, Y. I. Kwak, P. E. Waterman, E. P. Lesho, and P. Mc Gann. 2012. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by Real-Time PCR. *PLoS One.* 7:1-6.
- Corzo, A., Fritts, C. A., Kidd, M. T. and Kerr, B. J. 2005. Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crude protein diets. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 118: 319-327.
- Cowieson, A. J. 2005. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 119: 293–305.

- Cowieson, A. J., Ravindran, V., and Selle P. H. 2008. Influence of Dietary Phytic Acid and Source of Microbial Phytase on Ileal Endogenous Amino Acid Flows in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 87:2287–2299.
- Cox, C. M., Sumners, L. H., Kim, S., McElroy, A. P., Bedford, M. R. and Dalloul, R. A. 2010. Immune responses to dietary β -glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* 89:2597-607.
- Cross, D. E., Svoboda, K., McDevitt, R. M. and Acamovic, T. 2003. The performance of chickens fed diets with and without thyme oil and enzymes. *Br. Poult. Sci.* 44:18-19.
- Cross, D. E., McDevitt, R. M., Hillman, K. and Acamovic, T. 2007. Effect of herbs and their associated essential oils on the performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7-28 days of age. *Br. Poult. Sci.* 48: 496-506.
- Cross, D.E., R.M. McDevitt and T. Acamovic. 2011. Herbs, thyme essential oil and condensed tannin extracts as dietary supplements for broilers, and their effects on performance, digestibility, volatile fatty acids and organoleptic properties. *Br. Poult. Sci.* 52: 227-237.
- Cummings, JH, Macfarlane, GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Microbiol.* 70:443-459.
- Cummings, J. H., Antoine, J. M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., Gibson, G. R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijthelaars, S., Watzl, B. 2014. Gut health and immunity. *Eur. J. Nutr.* 43: 118–173.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food. Microbiol.* 74:101–109.
- Delles, R. M., Xiong, Y. L., True, A. D., Ao, T, and Dawson, K. A. 2014. Dietary antioxidant supplementation enhances lipid and protein oxidative stability of chicken broiler meat through promotion of antioxidant enzyme activity. *Poult. Sci.* 93:1561–1570.
- Delroisse, J. M., A. L. Boulvin, I. Parmentier, R. D. Dauphin, M. Vandenbol, and D. Portetelle. 2008. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiol. Res.* 163:663-670.

Du, E., W. Wang, L. Gan, Z. Li, S. Guo, and Guo. Y. 2016. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. J. Anim. Sci. Biotechnol. 7:2-10.

Ducatelle, R., Goossens, E., Meyer, F. D., Eeckhaut, V., Antonissen, G., Haesebrouck, F. and Immersee, F. V. 2018. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. Vet Res 49:43.

Ebrahimi, A., Qotbi, A. A. A., and Seidavi, A. 2013. The effects of different levels of dried *Citrus sinensis* peel on broiler carcass quality. Acta. Sci. Vet. 41: 1169.

EC 43. Council Directive of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. Official Journal of the European Union L. 182: 19-28.

EDQM. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare 2.8. Methods in pharmacognosy, 2.8.12. 2005. Determination of essential oils in vegetable drugs. European Pharmacopoeia 5.0. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, France. 217-218.

EU 63. Directive of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union L,276: 33-79.

El-Ghousein, S. S. and Al-Beitawi, N. A. 2009. The effect of crushed thyme (*Thymus vulgaris* L) on growth, blood constituents, gastrointestinal tract and carcass characteristics of broiler chickens. Poult. Sci. 46:100-104.

El-Latif, A. S. A., Saleh, N. S., Allam, T. S., and Ghazy, E. W. 2013. The effects of Rosemary (*Rosemarinus officinalis*) and Garlic (*Allium sativum*) essential oils on performance, hematological, biochemical and immunological parameters of broiler chickens. Br. Poult. Sci. 2:16-24.

Erhan, M. K., Bolukbası, S. C., Urusan, H. 2012. Biological activities of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) in broilers. Livest. Sci. 146:189–192.

Ertas, O. S., Guler, T., Ciftci, M., Dalkilic, B. and Simse, U. 2005. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. Int. J. Poult. Sci. 4: 879-884.

Faix, S., Faixova, Z., Placha, I., and Koppel, J. 2009. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on antioxidative status in broiler chickens. *Acta. Vet. Brno.* 78: 411-417.

Fallah, R., Kiani, A., Azarfar, A. 2013. Effect of artichoke leaves meal and mentha extract (*Mentha piperita*) on immune cells and blood biochemical parameters of broilers. *G. V. J.* 10: 99-102.

Falowo, A. B., Fayemi, P. O., and Muchenje, V. 2014. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food. Res. Int.* 64:171-181.

Fasseas MK, Mountzouris KC, Tarantilis PA, Polissiou M and Zervas G (2008) Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* **106** (3): 1188-1194.

Franciosini, M. P., P. Casagrande-Proietti, C. Forte, D. Beghelli, G. Acuti, D. Zanichelli, A. Bosco, C. Castellini and M. Trabalza-Marinucci. 2015. Effects of oregano (*Origanum vulgare* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) aqueous extracts on broiler performance, immune function and intestinal microbial population. *J. Appl. Anim. Res.* 44:474–479.

Frankic, T., Voljc, M., Salobir, J., Rezar, V. 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agric Slov.* 94: 95–102.

Freitas, D. M., Vieira, S. L. Angel, C. R., Favero, A., and Maiorka, A. 2011. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *J. Appl. Poult. Res.* 20:322–334.

Figueiredo, M. V. B, Burity, H. A., Martinez, C. R., Chanway, C. P. 2008. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus xRhizobium tropici*. *Applied. Soil. Ecol.* 40:182–188.

Flint, H. J., S. H. Duncan, K. P. Scott, and P. Louis. 2014. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 3:1-10.

Foley W.J., Lassak E.V., and Brophy J. (1987) Digestion and absorption of Eucalyptus essential oils in greater glider (*Petauroides volans*) and brushtail Possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chemical Ecology*, 13:2115-2130

Galib, A. M. and Al-Kassie. 2010. The role of peppermint (*Mentha piperita*) on performance in broiler diets. *ABJNA.* 1: 1009-1013.

- Ghalamkari, G., Toghyani, M., Tavalaeian, E., Landy, N., Ghalamkari, Z., and Radnezhad, H. 2011. Efficiency of different levels of *Satureja hortensis* L. (Savory) in comparison with an antibiotic growth promoter on performance, carcass traits, immune responses and serum biochemical parameters in broiler chickens. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 13318-13323.
- Ghazalah, A. A. and Ali, A. M. 2008. Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 7: 234-239.
- Gheisar, M. M. and Kim, I. H. 2016. Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Ital. J. Anim. Sci.* 17:92-99.
- Giannenas, I., Florou Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N. A. and Spais, A. B. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria Tenella*. *Arch. Anim. Nutr.* 57: 99-106.
- Goni, I., Brenes, A., Centeno, C., Viveros, A., Saurocalixto, F., Rebda, A., Arja, I. and Estevez, R. 2007. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poult. Sci.* 86: 508-516.
- Govaris, A., Botsoglou, E., Florou-Paneri, P., Moulas, A. and Papageorgiou G. 2005. Dietary Supplementation of Oregano Essential Oil and α -tocopheryl Acetate on Microbial Growth and Lipid Oxidation of Turkey Breast Fillets During Storage. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 969-975.
- Hafeez, A., Manner, K., Schieder, C., and Zentek, J. 2016. Effect of supplementation of phytogenic feed additives (powdered vs. encapsulated) on performance and nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult. Sci.* 95:622–629.
- Hajati H., Hasanabadi, A. and Waldroup, P. W. 2011. Effects of dietary Supplementation with pumpkin oil (*Cucurbita pepo*) on performance and blood fat of broiler chickens during finisher period. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 6: 40-44.
- Hashemi, S. R., and Davoodi, H. 2010. Phytogenics as new class of feed additive in poultry industry. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 2295-2304.
- Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A. and Veldkamp, T. 2013. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92: 2059-2069.

Hashemipour, H., H. Kermanshahi, A. Golian, and A. Raji. 2014. Effect of antibiotic alternatives on ileal microflora and intestinal histomorphology of broiler chickens fed wheat based diet. *Iran. J. Appl. Anim. Sci. Pub.* 4:135-142.

Hashemipour, H., V. Khaksar, L. A. Rubio, T. Veldkamp M.M., and Van Krimpen. 2016. Effect of feed supplementation with a thymol plus carvacrolmixture, in combination or not with an NSP-degrading enzyme, on productive and physiological parameters of broilers fed on wheat-based diets. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 211:117–131.

Hassan H.M.A., Youssef, A. W., Ali, H.M., and Mohamed, M.A. 2015. Adding phytogenic material and/or organic acids to broiler diets: Effect on performance, nutrient digestibility and net profit. *Asian. J. Poultry Sci.* 9: 97-105.

Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J. and Megias, M. D. 2004. Influence of two plant extracts on broiler performance digestibilities and digestive organ size. *Poult. Sci.* 83: 169-174.

Hernández, P., Juste, V., Zomeno, C., Moreno, J. R., and P. Penalver. 2009. Effect of dietary clove essential oil on poultry meat quality. <http://www.lidervet.com/eng/ensayo-campo-5.html>

Hew, L. I., Ravindran, V., Mollah, I., and Bryden, W. L. 1998. Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolisable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 75: 83-92.

Hill, F. W. and Anderson, D. L. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J. Nutr.* 64:587-603.

Hippenstiel, F., Abdel-Wareth, A. A., Kehraus, S. and Sudekum, K. H. 2011. Effects of selected herbs and essential oils and their active components on feed intake and performance of broilers-a review. *Archiv. Fur. Geflugelkunde.* 75:226-234.

Hoet, S., Ste´vigny, C., Herent, M.F., Quetin-Leclercq, J., 2006. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72, 480–482.

Hoffman-Pennesi, D. and Wu C. 2010. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal *Salmonella* population in broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 19: 432-443.

Hong, J. C., Steiner, T., Aufy, A. and Lien, T. F. 2012. Effect of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livest. Sci.* 144: 253-262.

- Hosseini, S. A., Meimandipour, A., Alami, F., Mahdavi, A., Mohiti-Asli, M., Lotfollahian, H., and Cross, D. 2013. Effects of ground thyme and probiotic supplements in diets on broiler performance, blood biochemistry and immunological response to sheep red blood cells. *Ital. J. Anim. Sci.* 12:116-120.
- Hosseinzadeh, Z. and Farhoomand, P. 2014. The effects of *Artemisia dracunculus* powders different levels on blood parameters and internal organs weight broiler chickens. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2:661-68.
- Housmand, M., Azhar, K., Zulkifli, I., Bejo, M.H. and Kamyab A. 2012. Effects of non-antibiotic feed additives on performance, immunity and intestinal morphology of broilers fed different levels of protein. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 42:22-31.
- Hu, C. H., L.Y. Gu, Z. S. Luan, J. Song, and K. Zhu. 2012. Effects of montmorillonite–zinc oxide hybrid on performance, diarrhea, intestinal permeability and morphology of weanling pigs. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 177: 108-115.
- Huang, C. M., and Lee, T. T. 2018. Immunomodulatory effects of phytogenics in chickens and pigs — A review. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 31:617-627.
- Hubener, K., Vahjen, W. and Simon, O. 2002. Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. *Arch Anim Nutr* 2002;56:167–187.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R. and Immerseel, F. V. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187: 182–188.
- Inoye S., Takizawa T., and Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 47:565-573.
- Ipek, U. 2005. Removal of Ni(II) and Zn(II) from an aqueous solution by reverse osmosis. *Desalination.* 174: 161-169.
- Ivanov, I. I., and Littman, D. R. 2011. Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 14: 106–114.
- Jamroz, D, Orta, J., Kamel, C., Wiliczkievicz, A., Wartecki, T., Scorupinska, J. 2003. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, and gut microbial status in broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.* 12: 583-596.

- Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y., and Lee, C.Y. 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 134: 304–315.
- Jang, A., Liu, X.-D., Shin, M.-H., Lee, B.-D., Lee, S.-K., Lee, J.-H., and Jo, C. 2008. Antioxidative potential of raw breast meat from broiler chicks fed a dietary medicinal herb extract mix. *Poult. Sci.* 87:2382–2389.
- Jang, I. S., Ko, Y. H., Moon, Y. S., Sohn, S. H. 2014. Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, heat shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27:749-56.
- Kaiser, M. G., Cheeseman, J. H., Kaiser, P. and Lamont, S. J. 2006. Cytokine expression in chicken peripheral blood mononuclear cells after in vitro exposure to *Salmonella enteric serovar Enteritidis*. *Poult. Sci.* 85:1907-1911.
- Kaldhusdal M, Hofshagen M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of Necrotic Enteritis. 1992;71:1145-1153.
- Kamkar, A., Javan, A. J., Asadi, F. and Kamalinejad, M. 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food. Chem. Toxicol.* 48:1796-800.
- Kamran, Z., Mirza, A. M. and Mahmood, A. S. 2004. Effect of decreasing dietary protein levels with optimal amino acids profile on the performance of broilers. *Pak. Vet. J.* 24: 165- 168.
- Kamran, Z., Sarwar, M., Nisa, M., Nadeem, M. A., Mahmood, A. S., Babar, M. E. and Ahmed, S. 2008. Effect of low-protein diets having constant energy-to-protein ratio on performance and carcass characteristics of broiler chickens from one to thirty-five days of age. *Poult. Sci.* 87: 468-474.
- Kawai, T., and S. Akira 2007. TLR signaling. *Sem. Immunol.* 19:24-32.
- Keestra, A. M., M. R. Zoete, L. I. Bouwman, M. M. Vaeziradand, and J. P. M. Van. Putten. 2013. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 41:316-323.
- Keestra, A. M., M. R. Zoete, L. I. Bouwman, M. M. Vaeziradand, and J. P. M. Van. Putten. 2013. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 41:316-323.

- Khaksar, V., Krimpen, M. V., Hashemipour, M., and Pilevar, M. 2012. Effects of thyme essential oil on performance, some blood parameters and ileal microflora of Japanese quail. *J. Poult. Sci.* 49: 106-110.
- Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., and Laudadio, V. 2012. *Thymus vulgaris*: alternative to antibiotics in poultry feed. *Worlds. Poult. Sci. J.* 68:401-408.
- Khattak, F., Ronchi, A., Castelli P., Sparks N. 2014. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 93:132–137.
- Khodambashi Emami, N., Samie, A., Rahmani, H.R., and Ruiz-Feria, C.A. 2012. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 175:57-64.
- Kiarie E, Romero LF, Ravindran V. Growth performance, nutrient utilization, and digesta characteristics in broiler chickens fed corn or wheat diets without or with supplemental xylanase. *Poult Sci* 2014;93:1186–1196.
- Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S.H, Jang, S. I., Park, M. S. 2013. Immune effects of dietary anethole on *Eimeria acervulina* infection. *Poult Sci.* 92: 2625–2634.
- Kırkpınar, F., H. Bora Ünlü, and G. Özdemir. 2011. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livest. Sci.* 137: 219-225.
- Kumar, M., Kumar, V., Roy, D., Kushwaha, R. and Vaiswani S. 2014. Application of herbal feed additives in animal nutrition e a review. *Int. J. Livest. Res.* 4:1-8.
- Lan, Y., M.W.A, Verstegen, S. Tamminga, and B.A. Williams. 2004. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *Worlds Poult. Sci.* 61:95-104.
- Laudadio, V., Passantino, L., Perillo, A., Lopresti, G., Passantino, A., Khan, R. U. and Tufarelli, V. 2012. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poult. Sci.* 91: 265-270.
- Lee, K. W., Kappert, H. J., Frehner, M., Losa, R. and Beynen, A. C. 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 44: 450-457.

- Lee, K. W., Everts, H. and Beynen, AC. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poult. Sci.* 3: 738-752.
- Lee, S. A., Apajalahti, J., Vienola, K., González-Ortiz, G., Fontes, C. M. G. A and Bedford, M. R. 2017. Age and dietary xylanase supplementation affects ileal sugar residues and short chain fatty acid concentration in the ileum and caecum of broiler chickens. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 234:29-42.
- Lillehoj, H. S., and K. W. Lee. 2012. Immune modulation of innate immunity as alternatives-to-antibiotics strategies to mitigate the use of drugs in poultry production. *Poult. Sci.* 91:1286-1291.
- Lin, H., Decuypere, E. and Buyse, J. 2004. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 139:737-44.
- Littman, D. R., and Pamer, E. G. 2011. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host & Microbe.* 10,10: 311-323.
- Liu D, Guo S, Guo Y. Xylanase supplementation to a wheat-based diet alleviated the intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged by *Clostridium perfringens*. *Avian Pathol* 2012;41:292-298.
- Lobell, D. B., Hammer, G. L., McLean, G., Messina, C., Roberts, M. J., and Schlenker, W. 2013. The critical role of extreme heat for maize production in the United States. *Nature climate change* www.nature.com/natureclimatechange. DOI: 10.1038/NCLIMATE1832
- Lopetuso, L. R., F. Scaldaferri, V. Petito, and A. Gasbarrini. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut. Pathog.* 5:23.
- Lopez-Bote, C. J., Gray, J. L., Gomaa, E. A. and Flegal, C. J. 1998. Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *Br. Poult. Sci.* 39: 235-240.
- Lovkova M. Ya., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M. and Klimenteva, N. I. 2001. Chemical features of medicinal plants (Review). *Appl. Biochem. Micro.* 37:229-237.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6816–6824.

Lu, H., Adedokun, S. A., Adeola, L. and Ajuwon, K. M. 2014. Anti-inflammatory effects of nonantibiotic alternatives in *Coccidia* challenged broiler chickens. *J. Poult. Sci.* 51:14-21.

Luna, A., Labaque, M. C., Zygadlo, J. A. and Marin, R. H. 2010. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult. Sci.* 89: 366-370.

MacKinnon, K.M., H. He, J.R. Nerren, C.L. Swaggerty, K.J. Genovese, and M.H. Kogut. 2009. Expression profile of Toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella enteritidis*-infected broiler chickens. *Vet. Microbiol.*137:313–319.

Magalhaes, J.G., Tattoli, I., Girardin, S.E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in Immunology* 2007;19,106-115.

Malayoglu, H. B., Baysal, S., Misirlioglu, Z., Polat, M., Yilmaz, H. and Turan, N. 2010. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat–soybean meal diets. *Br. Poult. Sci.* 51:67-80.

Marcincakova, D., Certík, M., Marcincak, S., Popelka, P., Simkova, J., Klempova, T., Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N. I., Fremaut, D., Maene, P., and De Smet, S. 2008. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans- cinnamaldehyde along the gastrointestinal of piglets. *J. Sci. Food. Agric.* 88:2371–2381.

Marshall, O. J. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *BMC. J.* 20:2471-72.

Marquardt, R. R. 1983. A simple spectrophotometric method for the direct determination of uric acid in avian excreta. *Poult. Sci.* 62:2106-2108.

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

Michiels, J., J. Missotten, D. Fremaut, S. De Smet, and N. Dierick. 2007. In vitro dose–response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and

interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livest. Sci.* 109:157–160.

Michiels, J., J. Missotten, N. I. Dierick, D. Fremaut, P. Maene, and S. De Smet. 2008. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans- cinnamaldehyde along the gastrointestinal of piglets. *J. Sci. Food. Agric.* 88:2371–2381.

Miguel, M. C. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential Oils: A short review. *Molecules* 15: 9252-9287.

Mitsch, P. Zitterl-Eglseer, K., Kohler, B., Gabler, C., Losa, R., and Zimpernik, I. 2004. The Effect of Two Different Blends of Essential Oil Components on the Proliferation of *Clostridium perfringens* in the Intestines of Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 83:669–675.

Mohammed, A. A., and Abbas, R. J. 2009. The Effect of Using Fennel Seeds (*Foeniculum vulgare* L.) on Productive Performance of Broiler Chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 8: 642-644.

Mountzouris, K. C., Paraskeuas, V. and Fegeros, K. 2009. Phytogenic compounds in broiler nutrition. In ‘Phytogenics in animal nutrition’. (Ed. T Steiner) pp. 97-110. (Nottingham University Press:Nottingham).

Mountzouris, K. C., Paraskeuas, 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. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 168: 223- 231.

Mourey, A., and Canillac, N., 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food. Control.* 13: 289– 292.

Mueller, K., Blum, N. M., and Mueller, A. S. 2013. Examination of the anti-inflammatory, antioxidant, and xenobiotic-inducing potential of *Broccoli* extract and various essential oils during a mild DSS-induced *Colitis* in rats. *ISRN Gastroenterol* 2013: 710856.

Najafi, P. and Torki, M. 2010. Performance, blood metabolites and immunocompetence of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. *J. Animal. Veterinary. Adv.* 9: 1164-1168.

- Neto, M. G., Pesti, G. M. and Bakalli, R. I. 2000. Influence of dietary protein level on the broiler chicken's response to methionine and betaine supplements. *Poult. Sci.* 79: 1478-1484.
- Nobakht, A., Norani, J. and Safamehr, A. 2011. The effects of different amounts of *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. *J. Med. Plant. Res.* 5: 3763-3768.
- Nobakht, A. and Moghaddam, M. 2012. The effects of using different levels of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) medicinal plant on performance, egg traits, blood biochemical parameters and Immunity cells of laying hens. *Afr. J. Agric. Res.* 7:1682-1686.
- Ocak, N., Erener, G., Sungu, M., Altop, A., Ozmen, A. 2008. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. *Czech. J. Anim Sci.* 53: 169–175.
- Paraskeuas, V., K. Fegeros, I. Palamidi, G. Theodoropoulos, and K. C. Mountzouris. 2016. Phytogenic administration and reduction of dietary energy and protein levels affects growth performance, nutrient digestibility and antioxidant status of broilers. *J. Poult. Sci.* 53: 264-273.
- Paraskeuas, V., Fegeros, K., Palamidi, I., Hunger, C, and K. C. Mountzouris. 2017a. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different phytogenic levels. *Ani. Nu.* 3: 114-120.
- Paraskeuas, V., K. Fegeros, C. Hunger, G. Theodorou, and K. C. Mountzouris. 2017b. Dietary inclusion level effects of a phytogenic characterized by menthol and anethole on broiler growth performance, biochemical parameters including total antioxidant capacity and gene expression of immune-related biomarkers. *Anim. Prod. Sci.* 57:33-41.
- Paraskeuas, V. and Mountzouris, K. C. 2019a. Broiler gut microbiota and expressions of gut barrier genes affected by cereal type and phytogenic inclusion. *Anim. Nutr.* 5: 22-31.
- Paraskeuas, V. and Mountzouris, K. C. 2019b. Modulation of broiler gut microbiota and gene expression of Toll-like receptors and tight junction proteins by diet type and inclusion of phytogenics. *Poult. Sci.* <https://doi.org/10.3382/ps/pey588>

- Pathak, M., Mandal, G., Patra, A. K., Samanta, I., Pradhan, S. and Haldar, S. 2016. Effects of dietary supplementation of cinnamaldehyde and formic acid on growth performance, intestinal microbiota and immune response in broiler chickens. *Animal Prod. Sci.* 57:821-827.
- Peinado. M. J., Ruiz. R., Echávarri. A., Aranda-Olmedo. I, Rubio. L.A. 2013. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 181: 87-92.
- Peter, C.M., Han, Y., Boling-frankenbach, S.D., Parsons, C.M., Baker, D.H., 2000. Limiting order of amino acids and the effects of phytase on protein quality in maize gluten meal fed to young chicks. *J. Anim. Sci.* 78: 2150–2156.
- Petrovic, V, Tuckova, M., and Baca, M. 2011. Effect of dietary supplementation of *Melissa officinalis* and combination of *Achillea millefolium* and *Crataegus oxyacantha* on broiler growth performance, fatty acid composition and lipid oxidation of chicken meat. *Ital. J. Anim. Sci.* 10:165-170.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic. Acids. Res.* 29:900.
- Pirgozliev, V., Bravo D, Mirza M. W., and Rose, S. P. 2015. Growth performance and endogenous losses of broilers fed wheat-based diets with and without essential oils and xylanase supplementation. *Poult. Sci.* 94:1227–1232.
- Placha, I., J. Takacova, M. Ryzner, K. Cobanova, A. Laukova, V. Strompfova, K. Venglovská, and S. Faix. 2014. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *Br. Poult. Sci.* 55:105-114.
- Polat, U., Yesilbag Dand Eren, M. 2011. Serum biochemical profile of broiler chickens fed diets containing rosemary and rosemary volatile oil. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (J B E S).* 5: 23-30.
- Ponte, P. I. P., Mendes, I., Quaresma, M., Aguiar, M. N. M., Lemos, J. P. C., Fereira, L. M. A., Soares, M. A. C., Alfaia, C. M., Prates, J. A. M. and Fontes, C. M. G. A. 2004. Cholesterol levels and sensory characteristics of meat from broilers consuming moderate to high levels of alfalfa. *Poult. Sci.* 83:810-814.
- Popovic, S., Puvaca, N., Kostadinovic, L., Dzinic, N., Bosnjak, J., Vasiljevic M, and Djuragic, O. 2016. Effects of dietary essential oils on productive performance, blood

lipid profile, enzyme activity and immunological response of broiler chickens
Europ.Poult.Sci., 80:1-12.

Placha, I., J. Takacova, M. Ryzner, K. Cobanova, A. Laukova, V. Strompfova, K. Venglovská, and S. Faix. 2014. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. Br. Poult. Sci. 55:105-114.

Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M. and Howard, L. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity(ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. J. Agric. Food. Chem. 51:3273-79.

Puvaca, N., Stanacev, V., Glamocic, D., Levic, J., Peric, L., Stanacev, V. and Milic, D. 2013. Beneficial effects of phytoadditives in broiler nutrition. World's Poultry Science Journal. 69: 27-34.

Radudienne, J., Jupidienne, A., Peeiulyte, D., and Janulis, V. 2005. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum Vulgare*. Biologia (Lietuvus Moskva Academy). 4:55-58.

Rahimi, S., Teymouri, Zadeh, Z., Karimi Torshizi, M. A., Omidbaigi, R., and Rokni, H. 2011. Effect of the Three Herbal Extracts on Growth Performance, Immune System, Blood Factors and Intestinal Selected Bacterial Population in Broiler Chickens. J. Agr. Sci. Tech. 13: 527-539.

Ranum, P. Pena-Rosas, J. P., and Garcia-Casal, M. N. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1312:105-112.

Ravindran, V., Hew, L. I., Ravindran, G. and Bryden, W. L. 2005. Apparent ileal digestibility of amino acids in dietary ingredients for broiler chickens. Anim. Sci. 81: 85-97.

Rochell, S. J., A. Helmbrecht, C. M. Parsons, and R. N. Dilger. 2016. Influence of dietary amino acid reductions and *Eimeria acervulina* infection on growth performance and intestinal cytokine responses of broilers fed low crude protein diets. Poult. Sci. 95:2602–2614.

Rodriguez ML, Rebole A, Velasco S, Ortiz LT, Trevino J, Alzueta C. 2012. Wheat- and barley-based diets with or without additives influence broiler chicken performance, nutrient digestibility and intestinal microflora. J Sci Food Agric 2012;92:184-190.

Roofchaei, A., Irani, M., Ebrahimzadeh, M. A. and Akbari, M. R. 2011. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 6177- 6183.

Ruberto, G., Barrata, M., Sari, M. and Kaabehe, M. (2002) Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour. Fragr. J.* 17: 251-254.

Sa, R. C. S., Andrade, L. N., Oliveira, R. R. B., and Sousa, D. P. 2014. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules* 19: 1459-1480.

Sacranie, A., B. Svihus, V. Denstadli, B. Moen, P. A. Iji, and M. Choct. 2012. The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 91:693–700.

Salma, U., Miah, A. G., Maki, T., Nishimura, M. and Tsujii, H. 2007. Effect of dietary *Rhodobacter capsulans* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poult. Sci.* 86:1920-1926.

Samadi and Frank Liebert. 2007. Lysine requirement of fast growing chickens- Effects of age, sex, level, of protein deposition and dietary lysine efficiency. *J. Poult. Sci.*, 44: 63-72.

Sacranie, A., B. Svihus, V. Denstadli, B. Moen, P. A. Iji, and M. Choct. 2012. The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 91:693–700.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid M. and Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80: S147–S171.

Safamehr, A., Mirahmadi, M., Nobakht, A. 2012. Effect of nettle (*Urtica dioica*) medicinal plant on growth performance, immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chickens. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci.* 3:721-728.

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

- Senatore, F., 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). J. Agric. Food. Chem. 44: 1327– 1332.
- Shojaii, A. and Fard, M. A. 2012. Review of pharmacological properties and chemical constituents of Pimpinella anisum. ISRN Pharmacol. 510795.
- Silkie, S. S., and K. L. Nelson. 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. Water. Res. 43:4860–4871.
- Simsek, U.G., Ciftci, M., Dalkilic, B., Guler, T., and Ertas, O.N.2007. The effects of dietary antibiotic and anise oil supplementation on body weight, carcass characteristics and organoleptic analysis of meat in broilers. Revue. Md. Vit. 158: 10, 514-518.
- Singh, R. P., Hodson, D. P., Huerta-Espino, J. P., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., Herrera-Foessel, S., Singh, P. K., Singh, S., and Govindan, V. 2011. The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. Annu. Rev. Phytopathol. 49:465–81.
- Smith, E. R., and Pesti, G. M. 1998. Influence of broiler strain cross and dietary protein on the performance of broilers. Poult. Sci. 77:276–281.
- Smith, R. L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J. I., Marnett, L. J., Portoghese, P. S., Waddell, W. J., Wagner, B. M., Hall, R.L., Higley, N. A., Lucas-Gavin, C., Adams, T. B. 2005. A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. Food Chem. Toxicol. 43, 345–363.
- Soltan, M. A, Shewitta, R. S. and El-Katcha, M. I. 2008. Effects of diary anise seeds supplementation on growth performance, immune response, carcass traits and some blood parameters of broiler chickens. Int. J. Poult. Sci. 7: 1078- 1088.
- Song, J., K. Xiao , Y. L. Ke, L. F. Jiao , C. H. Hu, Q. Y. Diao, B. Shi, and X. T. Zou. 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. Poult. Sci. 93 :581–588.
- Steiner, Z., Domacinovic, M., Antunovic, Z., Steiner, Z., Sencic, D., Wagner, J. and Kis, D. 2008. Effect of dietary protein/energy combinations on male broiler breeder performance. Acta. Agric. Slov. 2: 107-115.

- Sugiharto, S. 2016. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 15:99-111.
- Suzuki, T., and H. Hara. 2011. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem.* 22:401–408.
- Svihus, B. M., Choct, M., Classen, H. L. 2013. Function and nutritional roles of the avian caeca: a review. *Worlds. Poult. Sci. J.* 269:249-264.
- Tabeidian, A., Sadeghi, G. H. and Pourreza J. 2005. Effect of dietary protein levels and soybean oil supplementation on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 799-803.
- Tihonen, K., Kettunen, H., Bento, M.H.L., Saarinen, M., Lahtinen, S., Ouwehand A.C., Schulze, H, and Rautonen, N. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *Br. Poult. Sci.* 51:381—392.
- Tipu, M. A., Akhtar, M. S., Anjumi, M. I. and Raja, M. L. 2006. New dimension of medical plants as animal feed. *Pak. Vet. J.* 26:144-148.
- Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., Mohammadrezaei, M. 2010. Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). *Livest. Sci.* 129:173-178.
- Traesel, C. K., Wolkmer, P., Schmidt, C., Silva, C. B., Paim, F. C., Rosa, A. P. 2011. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. *Comp. Clin. Pathol.* 20:453-60.
- Tsai, M. L., Lin, C. C., Lin, W. C. and Yang, C. H. 2011. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils, from five selected herbs. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 75:1977-83.
- Tsirtsikos, P., K. Fegeros, A. Kominakis, C. Balaskas, and K. C. Mountzouris. 2012. Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary phytogetic inclusion level in broilers. *Animal* 6:1049–1057.
- Ulluwishewa. D., Anderson. R. C., McNabb. W. C., Moughan. P. J., Wells. J. M, and Roy. N. C. 2011. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* 141: 769–776.
- Van Der Wielen, P. W. J. J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings B. A. P., Van Knapen, F. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal

microflora in broiler chickens during growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2536–2540.

Varel, V. H. 2002. Livestock manure odor abatement with plant-derived oils and nitrogen conservation with urease inhibitors: A review. *J. Anim. Sci.* 80:1-7.

Verma, R. S., Padalia, R. C., and Chauhan, A. 2010. Chemical Profiling of *Mentha spicata* L. var. 'viridis' and *Mentha citrata* L. Cultivars at Different Stages from the Kumaon Region of Western Himalaya. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 223-253.

Waldroup, P. W., Jiang, Q. and Fritts, C. A. 2005. Effects of supplementing broiler diets low in crude protein with essential and nonessential amino acids. *Int. J. Poult. Sci.* 4:425-431.

Wati, T., T. Ghosh, B, Syed, and S. Haldar. 2015. Comparative efficacy of a phytogenic feed additive and an antibiotic growth promoter on production performance, caecal microbial population and humoral immune response of broiler chickens inoculated with enteric pathogens. *Anim. Nutr.* 1:213–219.

Wei, H, Chen, G., Wang, R. J. and Peng J. 2015. Oregano essential oil decreased susceptibility to oxidative stress-induced dysfunction of intestinal epithelial barrier in rats. *J. Funct. Foods.* 18:1191–1199.

Williams, C. H., David, D. J. and Iismaa, O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci.* 59:381-185.

Windisch, W. M., Schedle, K., Plitzner, C., and Kroismayr, A. 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci.* 86:140-148.

Wlodarska, M., Willing, B. P., Bravo, D. M. and Finley, B. B. 2015. Phytonutrient diet supplementation promotes beneficial *Clostridia* species and intestinal mucus secretion resulting in protection against enteric infection. *Sci. Rep.* 5:9253.

Wu, I. B., Ravindran, V. Thomas, D. G., Birtles, M. J. and Hendriks, W. H. 2004. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Br. Poult. Sci.* 45:76-84.

- Yang, J., Liu, L., Sheikahmadi, A., Wang, Y., Li, C., Jiao, H., Lin, H. and Song, Z. 2015. Effects of corticosterone and dietary energy on immune function of broiler chickens. PLoS One. 10(3): e0119750.
- Youn, H. S., Lee, J. K., Choi, Y. J., Saitoh, S. I., Miyake, K., Hwang, D. H., Lee, J. Y. 2008. Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization. Biochem. Pharmacol . 75: 49 4 – 50 2.
- Young, J. F., Stagsted, J., Jensen, S. K, Karlsson, A. H. and Henckel, P. 2003. Ascorbic acid, α -tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. Poult. Sci. 82 : 1343-1351.
- Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H, and Piao, X. 2015. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. J. Anim. Sci. Biotechnol. 6:7.
- Zhang, G. F., Yang, Z. B., Wang, Y., Yang, W. R., Jiang, S. Z. and Gai, G. S. 2009. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens. Poult. Sci. 88:2159-2166.
- Zhang, G. G., Yang, Z. B., Wang, Y., and Yang, W. R. 2013. Effects of *Astragalus membranaceus* root processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens. Poult. Sci. 92:178–183.
- Zhou, Y., Jiang, Z., Lv, D., and Wang, T. 2009. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. Poult. Sci. 88 :316–322
- Zidan, D. E., Kahilo, K. A., El-Far, A. H., and Sadek, K. M. 2016. Ginger (*Zingiber officinale*) and thymol dietary supplementation improve the growth performance, immunity and antioxidant status in broilers. Glob. Vet. 16: 530-538.
- Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Peng, J, and Wei, H. 2016. Oregano essential oil improves intestinal morphology and expression of tight junction proteins associated with modulation of selected intestinal bacteria and immune status in a pig, model. Biomed. Res. Int. vol.2016.:1-11.

Ελληνική

- Βούλγαρη Π. Β., και Δρόσος Α. Α. 2003. Ιντερλευκίνη 18 και ο ρόλος της στα αυτοάνοσα νοσήματα. Αρχεία της Ελληνικής Ιατρικής. 20: 172-181.

Μαυρούλη Μ., Καψιμάλη Β., Τσακρής Α. 2014. Ρόλος των Toll-like υποδοχέων στη φυσική ανοσία. Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία. vol. 59 issue 4.

Παρασκευάς Βασίλειος. 2009. Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ενός προϊόντος φυτικών εκχυλισμάτων στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγικού τύπου. Μεταπτυχιακή Μελέτη. Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, και Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Παράρτημα. Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά και σε πρακτικά συνεδρίων, συμμετοχές σε ερευνητικά προγράμματα

***Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά στο πλαίσιο της
Διδακτορικής Διατριβής***

Paraskeuas, V., K. Fegeros, I. Palamidi, G. Theodoropoulos, and K. C. Mountzouris. 2016. Phytogenic administration and reduction of dietary energy and protein levels affects growth performance, nutrient digestibility and antioxidant status of broilers. J. Poult. Sci. 53: 264-273.

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

Paraskeuas, V., Fegeros, K., Hunger, C., Theodorou, G. and Mountzouris, K. C. 2017b. Dietary inclusion level effects of a phytogenic characterised by menthol and anethole on broiler growth performance, biochemical parameters including total antioxidant capacity and gene expression of immune-related biomarkers. Anim. Prod. Sci. 57:33-41.

Paraskeuas, V. and Mountzouris, K. C. 2019a. Broiler gut microbiota and expressions of gut barrier genes affected by cereal type and phytogenic inclusion. Anim. Nutr. 5: 22-31.

Paraskeuas, V. and Mountzouris, K. C. 2019b. Modulation of broiler gut microbiota and gene expression of Toll-like receptors and tight junction proteins by diet type and inclusion of phytogenics. Poult. Sci. <https://doi.org/10.3382/ps/pey588>

Λοιπές Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά Περιοδικά

Mountzouris, K. C., **Paraskeuas, V.** and Fegeros, K. 2009. Phytogenic compounds in broiler nutrition. In ‘‘Phytogenics in animal nutrition’’. (Ed. T Steiner) pp. 97-110. (Nottingham University Press:Nottingham).

Mountzouris, K. C., **Paraskeuas, 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. Anim. Feed. Sci. Technol. 168: 223- 231.

Mountzouris, K. C., Dalaka, E., Palamidi, I., **Paraskeuas, V.**, Demey, V., Theodoropoulos, G. and 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.

Palamidi, I., **Paraskeuas, V.**, Theodorou, G., Breitsma, R., Schatzmayr, G., Theodoropoulos, G., Fegeros, K. and Mountzouris, K. C. 2016. Effects of dietary acidifier supplementation on broiler growth performance, digestive and immune function indices. Anim. Prod. Sci. 57: 271-281.

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Ελληνικών Συνεδρίων

Νοικοκύρης Π., **Παρασκευάς Β.** 2005. Διερεύνηση της καταλυτικής δραστηριότητας της αμυλάσης στο λεπτό έντερο των ωοτόκων ορνίθων. 21^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ε.Ζ.Ε., Βέροια

Μουντζούρης, Κ., **Παρασκευάς, Β.**, Τσιρτσίκος Π., Λίππας, Θ. και Φεγγερός, Κ. 2008. Διερεύνηση της χρησιμοποίησης ενός προϊόντος φυτικών εκχυλισμάτων στη διατροφή ορνιθίων καπνοπαραγωγικού τύπου. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης (ειδική έκδοση) 34: 67-68.

Παλαμίδη, Ι., **Παρασκευάς, Β.**, Φεγγερός, Κ. και Μουντζούρης, Κ. 2013. Επίδραση της προσθήκης οξινιστή και αντιμικροβιακού αυξητικού παράγοντα στο σιτηρέσιο στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και την πεπτικότητα της τροφής σε ορνίθια κρεοπαραγωγής. 28^ο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε). Φλώρινα.

Παρασκευάς, Β., Παλαμίδη, Ι., Φεγγερός, Κ. και Μουντζούρης, Κ. 2013. Επίδραση της προσθήκης ενός μίγματος αιθέριων ελαίων σε σιτηρέσια με διαφορετικά επίπεδα

ενέργειας και πρωτεϊνών επί της ανάπτυξης κρεοπαραγωγών ορνιθίων και της πεπτικότητας της τροφής. 28^ο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε).Φλώρινα.

Παρασκευάς, Β., Παλαμίδη, Ι., Φεγγερός, Κ. και Μουντζούρης, Κ. 2014. Επίδραση του επιπέδου προσθήκης φυτικών εκχυλισμάτων σε σιτηρέσια με βάση τον αραβόσιτο ή τον σίτο επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της πεπτικότητας της τροφής, και επιλεγμένων βιοχημικών δεικτών του πλάσματος και του κρέατος παχυνόμενος ορνιθίων. 29^ο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε).Κυπαρισσία.

Παρασκευάς, Β., Γκρίελα, Ε, Φεγγερός, Κ. και Μουντζούρης, Κ. 2017. Επίδραση του σιτηρεσίου και μίγματος φυτικών εκχυλισμάτων επί της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και υγεία κρεοπαραγωγών ορνιθίων. 32^ο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε). Λάρισα.

Μουντζούρης, Κ., **Παρασκευάς, Β.,** Γκρίελα, Ε. και Φεγγερός Κ. 2018. Επίδραση της διαιτητικής προσθήκης φυτικών βιοενεργών συστατικών στην έκφραση κύτταρο-προστατευτικών γονιδίων και την αντιοξειδωτική ικανότητα του εντέρου κρεοπαραγωγών ορνιθίων. 33^ο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε). Λάρισα Οκτώβριος 2017. Πρέβεζα.

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Διεθνών Συνεδρίων

Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., **Paraskevas, V.** and Fegeros, K. 2008. Evaluation of the effect of a phytogenic essential oils product on broiler performance and nutrient digestibility. XXIII World's Poultry Congress. Brisbane, Australia.

Mountzouris, K. C., Palamidi, I., **Paraskeuas, V.,** Urbaityte, R., Pasteiner, S. and Fegeros, K. 2013. Effects of dietary acidifier administration in conjunction or not with an antimicrobial growth promoter on broiler performance and nutrient digestibility. 19th European Symposium on Poultry Nutrition. Potsdam, Germany.

Paraskeuas, V., Fegeros, K., Steiner, T. and Mountzouris, K. C. 2014. Phytogenic feed additive inclusion in diets differing in energy and protein levels affects

biochemical parameters and total antioxidant capacity of plasma and meat in broilers
International Poultry Scientific Forum. Atlanta, Georgia.

Mountzouris, K. C., **Paraskeuas, V.**, Griela, E., Kern, A. and Fegeros, K. 2018.
Agricultural University of Athens. Effects of dietary inclusion level of a phytogenic
premix on broiler growth performance, nutrient digestibility, total antioxidant
capacity and gene expression of antioxidant enzymes. The Southern Poultry Science
Society 39th Annual Meeting. Atlanta, Georgia.

Mountzouris, K. C., **Paraskeuas, V.**, Griela, E., Kern, A. and Fegeros, K. 2018.
Phytogenic inclusion level effects on broiler growth, nutrient digestibility, total
antioxidant capacity and antioxidant enzymes gene expressions. 11th Asian Pacific
Poultry Conference. Thailand.

Mountzouris, K. C., **Paraskeuas, V.**, Griela, E., Papadomichelakis, G and Fegeros, K.
2018. Phytogenic premix effects on gene expression of intestinal antioxidant enzymes
and broiler meat antioxidant capacity. The XVth European Poultry
Conference. Dubrovnik, Croatia.

Συμμετοχή σε ερευνητικά Προγράμματα

1. «Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας χρησιμοποίησης της ζύμης *Sacccharomyces cerevisiae* στη διατροφή κρεατοπαραγωγών ορνίθων υπό συνθήκες πειραματικής μόλυνσης», με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Αν. Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **17/12/2012** έως **31/05/2013**.
2. «Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογής των θρεπτικών ισοδύναμων (Matrix Values) επιλεγμένων ενζύμων στη διατροφή των ορνίθων κρεοπαραγωγής», με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Αν. Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **01/10/2015** έως **31/01/2016**.
3. «Αξιολόγηση των κινδύνων της κλιματικής αλλαγής», με Επι. Υπεύθυνο τον κ. Χρ. Καραβίτη, Αν. Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **11/07/2016** έως **31/08/2016**.
4. «Χαρτογράφηση και επιβεβαίωση των ισοδύναμων σε ενέργεια και πρωτεΐνη μιγμάτων φυτικών εκχυλισμάτων και προβιοτικών για την επίτευξη βέλτιστων αποδόσεων», με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Αν. Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, κατά τα χρονικά διαστήματα: από **04/01/2016** έως **30/06/2016**, από **15/09/2016** έως **31/12/2016**, από **15/02/2017** έως **31/07/2017**, από **01/09/2017** έως **31/12/2017** και από **15/03/2018** έως **15/06/2018**.
5. «Αξιολόγηση της επίδρασης μυκοτοξινών και φυτοβιοτικών στην εξέλιξη της εντερικής δυσβίωσης σε πειραματικό διατροφικό μοντέλο κρέατος», με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Αν. Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **11/06/2018** έως **25/07/2018**.