



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Διερεύνηση κρίσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική
ακεραιότητα και λειτουργία με πρότυπο τα πτηνά

Ειρήνη Κ. Γκρίελα

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μουντζούρης Κωνσταντίνος, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Μουντζούρης Κωνσταντίνος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μπαλάσκας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Παρασκευάς Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Διερεύνηση κρίσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία με πρότυπο τα πτηνά

“Investigation of critical biomarkers related to intestinal integrity and function in a bird model”

Ειρήνη Κ. Γκρίελα

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μουντζούρης Κωνσταντίνος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Μπαλάσκας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Παρασκευάς Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Πολίτης Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Παπαδομιχελάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Χάγερ Αριάδνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής ΓΠΑ

Διερεύνηση κρίσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία με πρότυπο τα πτηνά

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής,
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή (ΔΔ) διερευνήθηκαν σε βάθος οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα ορνιθίων κρεοπαραγωγής που σχετίζονται με την επίδραση στοχευμένων διατροφικών παραγόντων. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης πραγματοποιήθηκε μελετώντας μια σειρά επιλεγμένων εντερικών μοριακών βιοδεικτών, εμπλεκόμενων σε σημαντικά μοριακά μονοπάτια για την εντερική ακεραιότητα, λειτουργία και υγεία, παρακολουθώντας παράλληλα και τις παραγωγικές τους αποδόσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά *in vivo* πειράματα. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε σιτηρέσιο με διαφορετικά επίπεδα μεταβολιστέας ενέργειας (ΜΕ) και ολικής πρωτεΐνης (ΟΠ) με ή χωρίς την προσθήκη ενός φυτικού βιοενεργού συστατικού (ΦΒΣ) και στο άλλο χρησιμοποιήθηκε ένα δύσπεπτο σιτηρέσιο με ή χωρίς την προσθήκη μυκοτοξινών και συγκεκριμένα προσθήκη δεοξινυβαλενόλης (DON) και φουμονισινών (FUM). Προσδιορίστηκε ο ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), η κατανάλωση της τροφής (ΚΤ) και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ), και υλοποιήθηκε η μελέτη των μοριακών μονοπατιών που αφορούν τον εντερικό φραγμό, την αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική δράση, την ανοσιακή απόκριση, την κυτταρική απόπτωση καθώς και την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της σχετικής γονιδιακής έκφρασης. Τα παραπάνω αναλύθηκαν στο πλαίσιο τριών επιμέρους μελετών που αποτελούν και ξεχωριστά κεφάλαια της παρούσας ΔΔ.

Στην πρώτη και στη δεύτερη μελέτη εξετάστηκαν δύο τύποι σιτηρεσίου με βάση το % ποσοστό κάλυψης των συνιστομένων προδιαγραφών σε μεταβολιστέα ενέργεια (ΜΕ) και ολική πρωτεΐνη (ΟΠ) από τον παραγωγό του υβριδίου Cobb 500. Συγκεκριμένα, οι δύο τύποι σιτηρεσίων σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να καλύπτουν το 95% και το 100% των βέλτιστων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ, με σήμανση L και H, αντίστοιχα. Επίσης κάθε τύπος σιτηρεσίου εξετάστηκε με ή χωρίς την προσθήκη ΦΒΣ1 σε συγκέντρωση 150 mg/kg σιτηρεσίου. Για το σκοπό του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 540 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 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 του σιτηρεσίου (L και H) και την προσθήκη του ΦΒΣ1 (- και +). Βρέθηκε γενικά ότι τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων βελτιώθηκαν στις επεμβάσεις H- και H+ σε σύγκριση με τις L- και L+, και παράλληλα τα ορνίθια της επέμβασης L+ είχαν καλύτερο ΡΑΣΒ και ΣΕΤ σε σύγκριση με την επέμβαση L-. Ακόμα, τα ορνίθια που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου H παρουσίασαν υψηλότερο ΡΑΣΒ ($P_{\Delta} < 0.001$), ΚΤ ($P_{\Delta} = 0.046$) και χαμηλότερο ΣΕΤ ($P_{\Delta} < 0.001$) σε σύγκριση με την L επέμβαση. Επιπλέον, η προσθήκη ΦΒΣ1 αύξησε σημαντικά το ΡΑΣΒ ($P_{\Phi} = 0.002$) και βελτίωσε τον ΣΕΤ ($P_{\Phi} = 0.043$). Όσον αφορά τη σχετική γονιδιακή έκφραση (ΣΓΕ) με τη μείωση των ΜΕ και ΟΠ παρατηρήθηκε συγκέντρωση των αποτελεσμάτων στον ειλέο και στα τυφλά. Πιο συγκεκριμένα, σημειώθηκε ενεργοποίηση της ανοσιακής απόκρισης με τη στατιστικώς σημαντική αύξηση ($P_{\Delta} < 0.05$) των γονιδίων που αφορούν το TLR μονοπάτι. Παράλληλα, υπήρξαν ενδείξεις για την ενεργοποίηση των μονοπατιών που αφορούν την απόπτωση και την πρωτεϊνοσύνθεση με την αύξηση ($P_{\Delta} < 0.05$) δύο γονιδίων από αυτά που μελετήθηκαν. Τέλος, στα τυφλά παρατηρήθηκε αυξημένη γονιδιακή αντιοξειδωτική δράση στην L επέμβαση σε σχέση με την επέμβαση H. Η προσθήκη του ΦΒΣ1 επηρέασε τη γονιδιακή έκφραση κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο. Αναλυτικότερα, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($P_{\Phi} < 0.05$) των γονιδίων που αφορούν το TLR μονοπάτι και παράλληλα σημειώθηκε ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση με την αύξηση 7 γονιδίων από τα 13 με την προσθήκη του ΦΒΣ1. Τα αποτελέσματα για την αντιοξειδωτική δράση επιβεβαιώθηκαν με την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά την προσθήκη του ΦΒΣ1 ($P_{\Phi} < 0.05$).

Η μελέτη των μηχανισμών δράσης με την παρουσία ξеноβιοτικών εξετάστηκε στη 3^η μελέτη με την προσθήκη 2 διαφορετικών μυκοτοξινών, της δεοξινυβαλενόλης (DON) και των φουμονισινών (FUM) σε δύσπεπτο σιτηρέσιο. Το δύσπεπτο σιτηρέσιο καταρτίστηκε ως μοντέλο που ευνοεί την εντερική δυσβίωση στα παχυνόμενα ορνίθια. Συνολικά 378 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής (Ross 308) κατανεμήθηκαν τυχαία σε 3 πειραματικές επεμβάσεις για 39 ημέρες οι οποίες ήταν: DS (δύσπεπτο σιτηρέσιο) χωρίς άλλες προσθήκες που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, DS με προσθήκη DON (5 mg / kg σιτηρεσίου) και DS με προσθήκη FUM (20 mg / kg σιτηρεσίου). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στην παραπάνω μελέτη έγινε την ανάλυση διασποράς ANOVA. Βρέθηκε ότι ο ΡΑΣΒ και η ΚΤ διέφεραν σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων. Συγκεκριμένα, τα ορνίθια των επεμβάσεων DON και FUM

είχαν χαμηλότερο ($P = 0.002$) ΡΑΣΒ σε σύγκριση το DS. Επιπλέον, η επέμβαση FUM μείωσε σημαντικά την ΚΤ ($P = 0.018$) σε σύγκριση με την επέμβαση DS. Με την προσθήκη της DON το μονοπάτι που αφορά την αποτοξίνωση ενεργοποιήθηκε γονιδιακά στον δωδεκαδάκτυλο, στη νήστιδα και στον ειλεό, ενώ η αντιοξειδωτική δράση έδειξε να επηρεάζεται αρνητικά στον ειλεό και στα τυφλά. Επιπροσθέτως, η επέμβαση FUM έδειξε να επηρεάζει κυρίως τη γονιδιακή έκφραση στο δωδεκαδάκτυλο και στα τυφλά. Στον δωδεκαδάκτυλο συγκεκριμένα, αυξήθηκαν τα γονίδια που αφορούν την ανοσιακή απόκριση (*TLR4*, *NFκB1*) ενώ στα τυφλά επηρεάστηκε αρνητικά η αντιοξειδωτική δράση με την προσθήκη των φουμονισινών.

Συμπερασματικά, η έκφραση κρίσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία, βρέθηκε ότι επηρεάστηκε σημαντικά από τον τύπο του σιτηρεσίου και συγκεκριμένα από τις προδιαγραφές του σε μεταβολιστέα ενέργεια και ολική πρωτεΐνη, καθώς και από τη σύσταση του σιτηρεσίου με λιγότερο εύπεπτες ζωοτροφές. Επιπρόσθετα, σημαντική επίδραση επί των βιοδεικτών που μελετήθηκαν είχε η προσθήκη φυτικών βιοενεργών συστατικών καθώς και η παρουσία μυκοτοξινών στη τροφή. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής δημιουργήθηκε νέα γνώση σχετικά με το πρόσημο και την ένταση της έκφρασης γονιδίων σχετικών με τον εντερικό φραγμό και τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης, αντιοξειδωτικής άμυνας, ανοσιακής απόκρισης, κυτταρικής απόπτωσης και πρωτεϊνοσύνθεσης. Είναι σημαντικό ότι οι ανωτέρω επιδράσεις χαρτογραφήθηκαν κατά μήκος του εντέρου των κρεοπαραγωγών ορνιθίων αποκαλύπτοντας όχι μόνο τον τρόπο αλλά και τον τόπο δράσης των παραγόντων που μελετήθηκαν.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή ζώων

Λέξεις κλειδιά: φυτικά βιοενεργά συστατικά, ενέργεια, πρωτεΐνη, μυκοτοξίνες, εντερικός φραγμός, αποτοξίνωση, αντιοξειδωτική δράση, ανοσιακή απόκριση, απόπτωση, πρωτεϊνοσύνθεση

Investigation of critical biomarkers related to intestinal integrity and function in a bird model

*Department of Animal Science and Aquaculture,
Laboratory of Nutritional Physiology and Feeding*

ABSTRACT

The aim of the present thesis was to evaluate in depth the molecular mechanisms of action along the intestine of broiler chickens with the effects of targeted nutritional factors. The elucidation of the mechanisms of action was carried out by studying a series of selected intestinal molecular biomarkers, involved in important molecular pathways for intestinal integrity, function and health, while also monitoring their growth performances. For this purpose, two different *in vivo* experiments were conducted. The first one was based on dietary changes using a diet with different levels of metabolizable energy (ME) and crude protein (CP) with or without the addition of a phytogenic feed additive (PFA) and in the other an indigestible - dysbiotic diet was used with or without the addition of mycotoxins, specifically the addition of deoxynivalenol (DON) and fumonisins (FUM). Analytical determination of growth performances such as body weight gain (BWG), feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR) was carried out and the study of the molecular pathways related to the intestinal barrier, detoxification, antioxidant activity, immune response, cell apoptosis as well as protein synthesis through relative gene expression. The above measured and analyzed in the context of three individual studies which are also separate chapters of this thesis.

To be more specific, the first and the second studies was based in two types of diet designed to meet 95% and 100% of the optimal metabolizable energy (ME) and crude protein (CP) specifications of the Cobb 500, and are denoted as L and H, respectively. Addition or absence of PFA1 was performed at a concentration of 150 mg/kg per diet and 540 day-old male Cobb 500 broiler chickens were used. The experiment lasted 42 days. The statistical analysis of the results obtained in the 2 above studies was performed by the general linear model, with factors being the type of diet (L and H) and the addition of PFA1 (- and +). It was generally found that the growth performances of the broilers were improved in the H- and H+ treatments compared to the L- and L+, and at the same time the L+ treatment had a better BWG and FCR compared to the L-

treatment. Also, the broilers fed with the H diet showed higher BWG ($P_D < 0.001$), FI ($P_D = 0.046$) and lower FCR ($P_D < 0.001$) compared to the L treatment. In addition, the addition of PFA1 significantly increased BWG ($P_P = 0.002$) and improved FCR ($P_P = 0.043$). Regarding the relative gene expression (RGE) with the reduction of ME and CP, most of the results was observed in ileum and caecum. Specifically, there was an activation of the immune response with a significantly increase ($P_D < 0.05$) of genes related to the TLR pathway. At the same time, there were indications on the activation of pathways related to apoptosis and protein synthesis with the increase ($P_D < 0.05$) of 2 genes from those studied. Finally, an increased gene antioxidant activity was observed on L treatment compared to H in caecum. The addition of PFA1 affected gene expression mainly in the duodenum. Specifically, a significant reduction ($P_P < 0.05$) of genes related to the TLR pathway was found and at the same time an enhanced antioxidant activity was noted with the increase of 7 genes out of 13 with the addition of PFA1. The results for the antioxidant activity were confirmed by the increase of the total antioxidant capacity upon the addition of PFA1 ($P_P < 0.05$).

The third study examined the addition of 2 different mycotoxins, deoxynivalenol (DON) and fumonisins (FUM) in a less digestible - dysbiosis diet (DS). The DS diet was established as a model that promoted intestinal dysbiosis in broilers. A total of 378 male broiler chickens (Ross 308) were randomly assigned to 3 experimental treatments for 39 days which were DS (without other additions used as a control), DS with added DON (5 mg/kg diet) and DS with added FUM (20 mg/kg diet). The statistical analysis of the results obtained in the above study was performed by ANOVA analysis. BWG and FI were found to be significantly different between interventions. Specifically, the chickens of the DON and FUM treatments had a lower ($P = 0.002$) BWG compared to the DS. In addition, FUM treatment significantly reduced FI ($P = 0.018$) compared with DS. Upon the addition of DON, the detoxification pathway was activated in the duodenum, jejunum and ileum, while antioxidant activity was shown to be negatively affected in the ileum and caecum. Additionally, FUM treatment was shown to primarily affect gene expression in the duodenum and cecum. In the duodenum specifically, the genes related to the immune response (*TLR4*, *NFkB1*) increased, while in the cecum the antioxidant activity was negatively affected by the addition of FUM.

In conclusion, the expression of critical biomarkers related to intestinal integrity and function was found to be significantly influenced by the type of diet and specifically by

its content in metabolizable energy and crude protein, as well as the general composition of the diet with participation of less digestible feedstuffs . Additionally, the supplementation of plant bioactive components as well as the presence of mycotoxins in the feed had a significant effect on the studied biomarkers. In the context of this thesis, new knowledge has been created regarding the intensity of the genes' expression related to the intestinal barrier and the molecular mechanisms of detoxification, antioxidant defense, immune response, cell apoptosis and protein synthesis. Importantly, the above effects were mapped along the gut of broiler chickens revealing not only the mode but also the site of action of the factors studied.

Scientific area: Animal nutrition

Key words: plant bioactive components, energy, protein, mycotoxins, intestinal barrier, detoxification, antioxidant activity, immune response, apoptosis, protein synthesis

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά πολλούς ανθρώπους που βοήθησαν με την παρουσία τους, με τις συμβουλές τους και με την στήριξή τους. Αρχικά, πρώτα από όλους ευχαριστώ εγκάρδια τον επιβλέποντα Καθηγητή μου και μέντορά μου, κ. Μουντζούρη Κωνσταντίνο, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής, που με την στήριξη και την καθοδήγησή του με βοήθησε από την προπτυχιακή μου πορεία να βρω τι μου αρέσει να κάνω στη ζωή μου επαγγελματικά.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Μπαλάσκα Χρήστο, Επίκουρο Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, για τη συμμετοχή του στη συμβουλευτική επιτροπή και τις πολύτιμες διορθώσεις και συμβουλές του. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Παρασκευά Βασίλειο για την άψογη συνεργασία, την πολύτιμη στήριξή του καθώς και τις αξιόλογες διορθώσεις του.

Θα ήθελα εξίσου να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες Μπρουκλόγιαννη Ιωάννη και Αναγνωστόπουλο Ευάγγελο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής και όλους τους συναδέλφους και προπτυχιακούς φοιτητές που βοήθησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και των εργαστηριακών αναλύσεων. Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους (αλφαβητικά) Γεωργάκη Δέσποινα, Ζαφειρόπουλο Φώτη, Ηλιοπούλου Ευγενία, Καραμανώλη Μαρία, Πετράτου Δήμητρα.

Τέλος, η εκπόνηση της παρούσας Διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση των γονιών μου Μπουραντά Γαρυφαλλιά και Γκρίελα Κωνσταντίνο, του αδελφού μου Γκρίελα Γιώργου καθώς και των φίλων μου που μου στάθηκαν σαν δεύτερη οικογένεια μου και μου παρείχαν το κατάλληλο περιβάλλον εκτός Πανεπιστημίου για την ολοκλήρωση των στόχων μου.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT.....	vi
Συνοτομογραφίες	1
Πίνακες	4
Σχήματα	7
1. Κεφάλαιο 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Φυσιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων.....	11
1.2. Εντερικό επιθήλιο ορνιθίων και μοριακά μονοπάτια.....	12
1.2.1. Εντερικός φραγμός-Πρωτεΐνες στενού συνδέσμου (Tight junctions) ...	14
1.2.2. Αποτοξίνωση (AHR μονοπάτι)	16
1.2.3. Αντιοξειδωτική απόκριση (Nrf2 μονοπάτι)	21
1.2.7. Αλληλεπίδραση μοριακών μονοπατιών.....	35
2. Κεφάλαιο 2-ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΟΡΝΙΘΙΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	41
2.1. Τύπος σιτηρεσίου- Επίπεδα ενέργειας και πρωτεΐνης	41
2.2. Βιοενεργά συστατικά	43
2.2.1. Παραγωγικά χαρακτηριστικά και ΦΒΣ	44
2.2.2. Εντερικός φραγμός και ΦΒΣ	50
2.2.3. AHR μονοπάτι και ΦΒΣ	51
2.2.4. Nrf2 μονοπάτι και ΦΒΣ	52
2.2.5. Επίδραση ΦΒΣ επί της ανοσολογικής απόκρισης, της κυτταρικής απόπτωσης και της πρωτεινοσύνθεσης.....	55
2.3. Ξενοβιοτικά.....	60
2.3.1. Μυκοτοξίνες και ορνίθια κρεοπαραγωγής.....	60
2.3.2. Επίδραση μυκοτοξινών στον εντερικό φραγμό	66
2.3.3. Επίδραση μυκοτοξινών στην αποτοξίνωση και στην αντιοξειδωτική απόκριση.....	67

2.3.4.	Επίδραση μυκοτοξινών στην ανοσιακή απόκριση, στην απόπτωση και στην πρωτεϊνοσύνθεση	69
3.	Κεφάλαιο 3- ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	71
4.	Κεφάλαιο 4- Επιδράσεις του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής	74
4.1.	Σκοπός.....	74
4.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	74
4.2.1.	Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις.....	74
4.2.2.	Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	76
4.2.3.	Δειγματοληψία ιστών.....	76
4.2.4.	Μοριακές αναλύσεις (απομόνωση RNA, παρασκευή cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση πραγματικού χρόνου).....	76
4.2.5.	Βιοχημικές αναλύσεις.....	80
4.2.6.	Στατιστική ανάλυση.....	80
4.3.	Αποτελέσματα.....	81
4.3.1.	Παραγωγικά χαρακτηριστικά	81
4.3.2.	Έκφραση γονιδίων σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα.....	82
4.3.3.	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (OAI) σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα 92	
4.3.4.	Σχετική γονιδιακή έκφραση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό κατά μήκος του εντέρου	95
4.4.	Συζήτηση-Σχολιασμός	98
5.	Κεφάλαιο 5-Προσδιορισμός των επιδράσεων του τύπου σιτηρεσίου και της χορήγησης ΦΒΣ στη σηματοδότηση των μονοπατιών TLR, MAPK και των κρίσιμων γονιδιακών συστατικών του μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής	102
5.1.	Σκοπός.....	102
5.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	102
5.2.1.	Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις.....	102

5.2.2.	Δειγματοληψία ιστών.....	102
5.2.3.	Μοριακές αναλύσεις (απομόνωση RNA, παρασκευή cDNA)	102
5.2.4.	Στατιστική ανάλυση.....	107
5.3.	Αποτελέσματα.....	107
5.3.1.	Παραγωγικά χαρακτηριστικά	107
5.3.2.	Σχετική Έκφραση των κρίσιμων Γονιδίων που μελετήθηκαν.....	107
5.4.	Συζήτηση.....	119
6.	Κεφάλαιο 6- Επιδράσεις της δεοξυριβουλενόλης και των φουμονισινών στην κυτταροπροστατευτική ικανότητα του εντέρου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής	122
6.1.	Σκοπός.....	122
6.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	122
6.2.1.	Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις.....	122
6.2.2.	Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων	124
6.2.3.	Δειγματοληψία ιστών.....	124
6.2.4.	Μοριακές αναλύσεις.....	124
6.2.5.	Στατιστική ανάλυση.....	129
6.3.	Αποτελέσματα.....	129
6.3.1.	Παραγωγικά χαρακτηριστικά	129
6.3.2.	Έκφραση γονιδίων σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα.....	130
6.4.	Συζήτηση-Σχολιασμός	146
7.	Κεφάλαιο 7-Σχολιασμός/Συμπεράσματα.....	151
	Βιβλιογραφία	164
	Παράρτημα. Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά και σε πρακτικά συνεδρίων, συμμετοχές σε ερευνητικά προγράμματα.....	198

Συντομογραφίες

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1/ πρωτεΐνη δέσμευσης 1 του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E

ACTB: actin-beta/ ακτίνη βήτα

Ahr1: aryl hydrocarbon receptor 1/ υποδοχέας αρυλ-υδρογονάνθρακα 1

Ahr2: aryl hydrocarbon receptor 2/ υποδοχέας αρυλ-υδρογονάνθρακα 2

AKT1: RAC-alpha serine threonine-protein kinase/ α-κινάση σερίνης θρεονίνης

AMPK: 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase PRKAA1/ πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη

APO-1/FAS: Fas cell surface death receptor/ υποδοχέας θανάτου στην επιφάνεια των κυττάρων Fas

ARE: antioxidant response element/ αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης

ARNT: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/ υποδοχέας μετατόπισης των αρυλ-υδρογονανθράκων στον πυρήνα

CAT : catalase/ καταλάση

CHUK: conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase/ διατηρημένη κινάση έλικας-βρόχου-έλικας

CLDN1 : claudin-1/ κλαουδίνη 1

CLDN5 : claudin-5/ κλαουδίνη 5

CYP1A1: cytochrome P450 1A1/ κυτόχρωμα P4501A1

CYP1A2 : cytochrome P450 1A2 / κυτόχρωμα P4501A2

CYP1B1: cytochrome P450 1B1/ κυτόχρωμα P4501B1

DON: δεοξυνιβαλενόλη

FOS: Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit/ Πρωτο-ογκογονίδιο FOS, υπομονάδα μεταγραφικού παράγοντα AP-1

FUM: φουμονισίνες

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης

GPX2 : glutathione peroxidase 2/ υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 2

GPX7 : glutathione peroxidase 7/ υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 7

GSR: glutathione-disulfide reductase/ αναγωγή της γλουταθειόνης-δισουλφιδίου

GSTA2 : glutathione S-transferase/ S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης

HMOX1 : heme oxygenase 1/ οξυγενάση της αίμης 1

HRAS: Harvey Rat sarcoma virus proto-oncogene, GTPase/ Πρωτο-ογκογονίδιο του σαρκώματος αρουραίων Harvey, GTPase

HSP70: heat shock protein 70/ πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70

HSP90: heat shock protein 90/ πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90

IFN β : interferon beta/ ιντερφερόνη β

IKK α : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/ αναστολέας του πυρηνικού παράγοντα KB της υπομονάδας 1

IL6: interleukin 6/ ιντερλευκίνη 6

IL8: interleukin 8/ ιντερλευκίνη 8

IRF3: interferon regulatory factor 3/ ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης 3

JUN: Jun proto-oncogene AP-1 transcription factor subunit/ Πρωτο-ογκογονίδιο JUN, υπομονάδα μεταγραφικού παράγοντα AP-1

Keap1: kelch like ECH associated protein 1/ πρωτεΐνη συσχετισμένη με kelch like ECH 1

LITAF: Lipopolysaccharide Induced TNF Factor/ Παράγοντας TNF που ενεργοποιείται από λιποπολυσακχαρίτες

MAPK9: mitogen-activated protein kinase 9/ πρωτεϊνική κινάση 9 ενεργοποιούμενη από μιτογόνο

MEK: mitogen-activated protein kinase/ πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο

mTOR: mechanistic target of rapamycin/ μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης

MUC2: mucin-2/ βλεννίνη-2

MyD88: myeloid differentiation primary response 88/ Πρωτεΐνη πρώιμης απόκρισης στη μυελοειδή διαφοροποίηση 88

NF- κ B1: Nuclear Factor Kappa B Subunit 1/ πυρηνικός παράγοντας KB της υπομονάδας 1

NQO1 : NAD(P)H quinone dehydrogenase 1/ NAD(P)H: αφυδρογονάση της κινόνης 1

Nrf2 : nuclear factor, erythroid 2 like 2/ Πυρηνικός παράγοντας 2 τύπου παράγοντα προερχόμενου από ερυθροειδές 2

OCN : occludin/ οκλουδίνη

P23: prostaglandin E synthase 3/ συνθάση της προσταγλανδίνης E3

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha/ φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5-διφωσφορική-καταλυτική υπομονάδα κινάσης α

PRDX1: peroxiredoxin-1/ υπεροξειρεδοξίνη-1

ROS: reactive oxygen species/ δραστικές μορφές οξυγόνου

S6K1: ribosomal protein S6 kinase B1/ κινάση B1 της ριβοσωματικής πρωτεΐνης S6

SOD1: superoxide dismutase 1/ δισμουτάση του υπεροξειδίου 1

TGFB1: transforming growth factor beta 1/ μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β1

TLR2B: Toll-like receptor 2/ toll – like υποδοχέας 2B

TLR3: toll like receptor 3/ toll – like υποδοχέας 3

TLR4: Toll-like receptor 4/ toll – like υποδοχέας 4

TRIF: toll like receptor adaptor molecule 1/ πρωτεΐνη προσαρμογέας του υποδοχέα toll-like

TSC2: tuberous sclerosis 2/ γονίδιο κονδυλώδους σκλήρυνσης-2

TXN: thioredoxin/ θειορεδοξίνη

XAP2: AH receptor-interacting protein/ πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα

XOR: xanthine oxidoreductase/ οξειδοαναγωγή της ξανθίνης

ZO1: zonula occludens-1/ ζονουλίνη 1

ZO2 : zonula occludens-2/ ζονουλίνη 2

ΚΤ: κατανάλωση τροφής

ΜΑΕ: μίγμα αιθέριων ελαίων

ΜΕ: μεταβολιστέα ενέργεια

ΟΠ: ολική πρωτεΐνη

ΠΘΣ: Πρωτεΐνες θερμικού σοκ

ΡΑΣΒ: ρυθμός αύξησης σωματικού βάρους

ΣΕΤ: συντελεστής εκμετάλλευσης τροφής

ΦΒΣ1: επέμβαση μίγματος φυτικού βιοενεργού συστατικού

Πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 1.1	Επιδράσεις στο μονοπάτι TLR σε ορνίθια κρεοπαραγωγής ανάλογα με το πρόσθετο ή την πρόκληση που πραγματοποιήθηκε	29
Πίνακας 2.1	Επιδράσεις της μείωσης ενέργειας και/ή πρωτεΐνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων	42
Πίνακας 2.2	Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βότανα και αιθέρια έλαια στην υγειονομική περίθαλψη των ζώων και την κτηνοτροφία	44
Πίνακας 2.3	Επίδραση των ΦΒΣ στις ζωοτεχνικές παραμέτρους	47
Πίνακας 2.4	Επίδραση ΦΒΣ σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το μονοπάτι του εντερικού φραγμού	50
Πίνακας 2.5	Περιπτώσεις μελετών σηματοδότησης AHR μονοπατιού σε ορνίθια που ασχολούνται με το θέμα της διατροφικής συμπερίληψης φυτοχημικών	52
Πίνακας 2.6	Περιπτώσεις μελετών σηματοδότησης Nrf2 μονοπατιού σε πτηνά που ασχολούνται με το θέμα της διατροφικής συμπερίληψης φυτοχημικών	53
Πίνακας 2.7	Επίδραση ΦΒΣ σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το TLR μονοπάτι	55
Πίνακας 2.8	Επίδραση ΦΒΣ σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το PI3K-Akt-mTOR μονοπάτι	58
Πίνακας 2.9	Τύποι και ακρωνύμια μυκοτοξινών, είδη μυκήτων ανάλογα με τη μυκοτοξίνη, διατροφικά σκευάσματα που μολύνουν και τα σημαντικότερα όρια των μυκοτοξινών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) στα επίπεδα τροφίμων και ζωοτροφών	62
Πίνακας 2.10	Επίδραση των μυκοτοξινών στις ζωοτεχνικές παραμέτρους	64
Πίνακας 2.11	Επίδραση των μυκοτοξινών στους βιοδείκτες του εντερικού φραγμού	67
Πίνακας 2.12	Μελέτες που αφορούν τα μονοπάτια AHR και Nrf2 σε πτηνά με την προσθήκη μυκοτοξινών	68
Πίνακας 4.1	Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων στόχων με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	78
Πίνακας 4.2	Συνολικά παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων	81
Πίνακας 4.3	Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στο βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου ορνιθίων 42 ημερών	84
Πίνακας 4.4	Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στο βλεννογόνο της νήσιδας ορνιθίων 42 ημερών	86
Πίνακας 4.5	Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στον βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων 42 ημερών	89
Πίνακας 4.6	Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στον βλεννογόνο των τυφλών σε ορνίθια 42 ημερών	91
Πίνακας 4.7	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (OAI) κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	94

Πίνακας 5.1	Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μελέτη	104
Πίνακας 5.2	Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like, μόρια-υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες, Ιντερλευκίνη 6, Ιντερλευκίνη 8, Ιντερφερόνη βήτα, παράγοντας νέκρωσης όγκων και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β στο επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	108
Πίνακας 5.3	Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό στο επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	109
Πίνακας 5.4	Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like, μόρια-υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες, Ιντερλευκίνη 6, Ιντερλευκίνη 8, Ιντερφερόνη βήτα, παράγοντας νέκρωσης όγκων και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β στο επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	111
Πίνακας 5.5	Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό στο επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	112
Πίνακας 5.6	Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like, μόρια-υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες, Ιντερλευκίνη 6, Ιντερλευκίνη 8, Ιντερφερόνη βήτα, παράγοντας νέκρωσης όγκων και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β στο επιθήλιο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	114
Πίνακας 5.7	Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό στο επιθήλιο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	115
Πίνακας 5.8	Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like, μόρια-υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες, Ιντερλευκίνη 6, Ιντερλευκίνη 8, Ιντερφερόνη βήτα, παράγοντας νέκρωσης όγκων και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	117
Πίνακας 5.9	Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	118
Πίνακας 6.1	Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων στόχων με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	126
Πίνακας 6.2	Παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων (1-39 μέρες)	129
Πίνακας 6.3	Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR), γονίδια μονοπατιού Nrf2 και γονίδια θερμικού σοκ (HSP70, HSP90) στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 39 ημερών	131

Πίνακας 6.4	Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 39 ημερών	133
Πίνακας 6.5	Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR), γονίδια μονοπατιού Nrf2 και γονίδια θερμικού σοκ (<i>HSP70</i> , <i>HSP90</i>) στη νήστιδα ορνιθίων 39 ημερών	135
Πίνακας 6.6	Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού στη νήστιδα ορνιθίων 39 ημερών	137
Πίνακας 6.7	Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR), γονίδια μονοπατιού Nrf2 και γονίδια θερμικού σοκ (<i>HSP70</i> , <i>HSP90</i>) στον ειλέο ορνιθίων 39 ημερών	139
Πίνακας 6.8	Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού στον ειλέο ορνιθίων 39 ημερών	141
Πίνακας 6.9	Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR), γονίδια μονοπατιού Nrf2 και γονίδια θερμικού σοκ (<i>HSP70</i> , <i>HSP90</i>) στα τυφλά ορνιθίων 39 ημερών	143
Πίνακας 6.10	Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού στα τυφλά ορνιθίων 39 ημερών	145
Πίνακας 7.1	Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής	163

Σχήματα

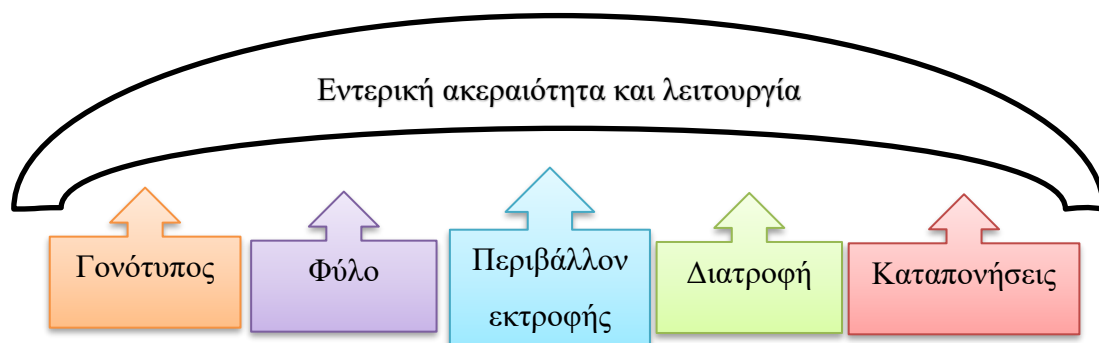
ΣΧΗΜΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Σχήμα 1	Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ομοιόσταση της εντερικής ακεραιότητας και λειτουργίας	9
Σχήμα 2	Κρίσιμοι μηχανισμοί που αφορούν την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία	10
Σχήμα 3	Οι μοριακοί βιοδείκτες του στενού συνδέσμου και η φυσιολογική τους σημασία στη μεταφορά ουσιών	16
Σχήμα 4	Μοριακό μονοπάτι AHR	20
Σχήμα 5	Μοριακό μονοπάτι Nrf2	25
Σχήμα 6	Μοριακό μονοπάτι TLRs	28
Σχήμα 7	Μοριακό μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR	32
Σχήμα 8	Μοριακό μονοπάτι MAPK	34
Σχήμα 9	Αλληλεπίδραση του εντερικού φραγμού με τα μονοπάτια TLR, Nrf2 και mTOR	36
Σχήμα 10	Γραφική αναπαράσταση ένζυμων φάσης I & II και η αλληλεπίδρασή τους	37
Σχήμα 11	Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών AHR-NRF2 και των αλληλεπιδράσεών τους	38
Σχήμα 12	Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών TLR/MAPK/PI3K-mTOR και των αλληλεπιδράσεών τους	40
Σχήμα 13	Σχηματική απεικόνιση της ΔΔ	73
Σχήμα 14	Αλληλεπίδρασεις διατροφής και ΦΒΣ1 στη σχετική γονιδιακή έκφραση του <i>HMOX1</i> στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου ορνιθίων 42 ημερών	82
Σχήμα 15	Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στη σχετική γονιδιακή έκφραση του <i>GPX2</i> στο βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων 42 ημερών.	87
Σχήμα 16	Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στη σχετική γονιδιακή έκφραση του <i>HMOX1</i> στο βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων 42 ημερών	88
Σχήμα 17	Αλληλεπίδρασεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (OAI) του βλεννογόνου στο δωδεκαδάκτυλο σε ορνίθια κρεοπαραγωγής 42 ημερών	92
Σχήμα 18	Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (OAI) στο βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών	93
Σχήμα 19	Σχετική γονιδιακή έκφραση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό κατά μήκος του εντέρου με την επίδραση της διατροφής	96
Σχήμα 20	Σχετική γονιδιακή έκφραση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό κατά μήκος του εντέρου με την προσθήκη ΦΒΣ1	97
Σχήμα 21	Επιδράσεις του σιτηρεσίου L σε σύγκριση με το σιτηρέσιο H στο μονοπάτι σηματοδότησης TLR, στο μονοπάτι	155

σηματοδότησης MAPK και PI3K-Akt-mTOR και στο μονοπάτι Nrf2 σε όλο το μήκος του εντέρου.

Σχήμα 22	Ευεργετικές επιδράσεις της προσθήκης ΦΒΣ στα μονοπάτια σηματοδότησης TLR, MAPK, PI3K-Akt-mTOR και Nrf2 σε όλο το μήκος του εντέρου.	155
Σχήμα 23	Επιδράσεις της προσθήκης δεοξυνιβαλενόλης (DON) στα μονοπάτια σηματοδότησης που μελετήθηκαν στη 2η μελέτη σε όλο το μήκος του εντέρου.	159
Σχήμα 24	Επιδράσεις της προσθήκης φουμονισινών (FUM) στα μονοπάτια σηματοδότησης που μελετήθηκαν στη 2η μελέτη σε όλο το μήκος του εντέρου.	159

1. Κεφάλαιο 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

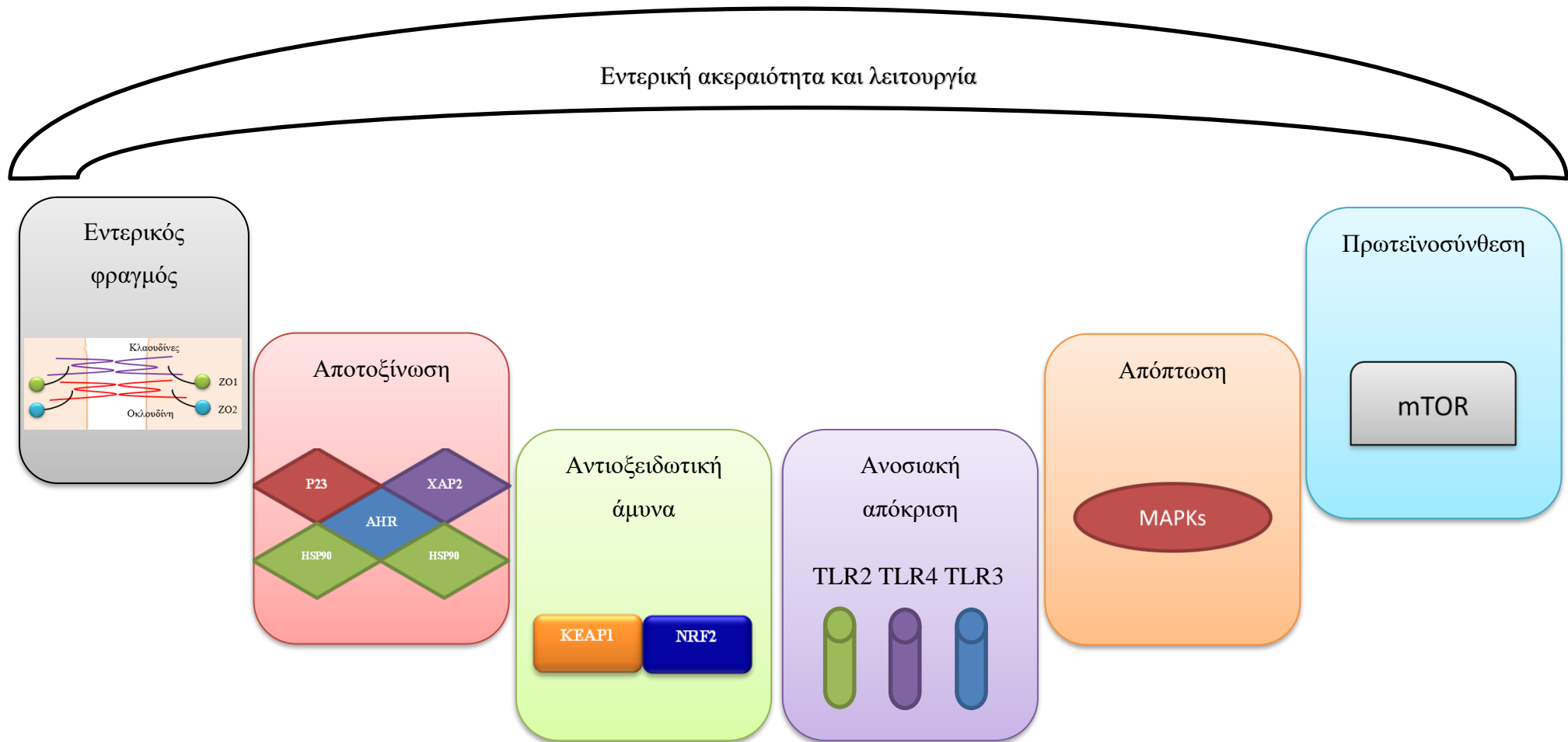
Η εντερική ακεραιότητα και λειτουργία των ζώων είναι μείζονος σημασίας για την παραγωγικότητα, την υγεία, την ευζωία και γενικότερα τη βιώσιμη ανάπτυξη στη ζωική παραγωγή. Κύριοι παράγοντες όπως ο γονότυπος (Mattioli et al., 2017; Baxter et al., 2021), το φύλο (Livingston et al., 2020; England et al., 2023b; a), το περιβάλλον εκτροφής (Zhao et al., 2014; El-Kazaz, 2018; Oloyo and Ojerinde, 2019; Novie Andri et al., 2022), η διατροφή (Ahiwe et al., 2018; Ravindran and Reza Abdollahi, 2021; Radulovic et al., 2021; Santos et al., 2022) και οι καταπονήσεις (Wicaksono et al., 2020; Liu et al., 2020b; Nawaz et al., 2021; Tang et al., 2022) παίζουν σημαντικό ρόλο για την ομοιοστατική διατήρηση της εντερικής ακεραιότητας και λειτουργίας (**σχήμα 1**).



Σχήμα 1. Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ομοιοστάση της εντερικής ακεραιότητας και λειτουργίας.

Η εντερική ακεραιότητα και λειτουργία είναι πολυσύνθετη και πολυπαραγοντική και αφορά σε κρίσιμους μηχανισμούς (**σχήμα 2**) που καθορίζουν:

- α) τον εντερικό φραγμό π.χ. σύνδεση των επιθηλιακών κυττάρων, βλεννοπρωτεΐνες (Lee et al., 2018a; Chelakkot et al., 2018; Stolfi et al., 2022),
- β) την αποτοξίνωση (Pernomian et al., 2020; Barroso et al., 2021; Pinto et al., 2023)
- γ) την αντιοξειδωτική άμυνα (Suzuki and Yanaka, 2018; Singh et al., 2019; Piotrowska et al., 2021)
- δ) την ανοσιακή απόκριση (Hug et al., 2018; Semin et al., 2021; Fang et al., 2022)
- ε) την απόπτωση (Wang et al., 2020a; Wan et al., 2022b) και
- ζ) τον μεταβολισμό (πρωτεϊνοσύνθεση) (Noureldein and Eid, 2018; Afzal et al., 2022; De Santis et al., 2023)



Σχήμα 2. Κρίσιμοι μηχανισμοί που αφορούν την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία.

Με δεδομένο ότι στην εντατική πτηνοτροφία χρησιμοποιούνται καθορισμένου γονότυπου πτηνά που εκτρέφονται σε ελεγχόμενο περιβάλλον, ιδιαίτερη σημασία για την ομοιοστάση της εντερικής ακεραιότητας και λειτουργίας έχει η διατροφή.

Η βελτίωση των παραγωγικών αποδόσεων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής είναι διαχρονικά στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος παραγωγών και επιστημόνων. Τα φυτικά βιοενεργά συστατικά (ΦΒΣ) θεωρούνται ασφαλείς παράγοντες προαγωγής της ανάπτυξης λόγω των αντιοξειδωτικών, των αντιμυκητιασικών και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους (Abdulameer and Alwan, 2022). Αντίθετα, οι μυκοτοξίνες θεωρούνται από τους ισχυρότερους «εχθρούς» των ορνιθίων μειώνοντας τις παραγωγικές αποδόσεις και προκαλώντας ανοσοτοξικότητα ασκώντας ιστοπαθολογικές αλλαγές που μπορούν να επηρεάσουν ακόμα και την επιβίωση των ορνιθίων (Kolawole et al., 2020; Yang et al., 2020).

Όπως προαναφέρθηκε οι παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων κεντρίζουν το πειραματικό ενδιαφέρον για αρκετές δεκαετίες. Παρόλα αυτά πίσω από την αύξηση ή την μείωση των παραγωγικών αποδόσεων υπάρχουν μηχανισμοί δράσης που σχετίζονται και χρειάζονται αποσαφήνιση. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών που προαναφέρθηκαν καθίσταται αναγκαία με σκοπό τον σχεδιασμό κατάλληλων στρατηγικών για την εκτίμηση και τη βελτίωση της υγείας των ορνιθίων (Mountzouris et al., 2019, 2020; Paraskeuas and Mountzouris, 2019b).

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητή η πρωτοτυπία των στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής που αφορά: α) στην μελέτη κρίσιμων μοριακών μονοπατιών που αφορούν τον εντερικό φραγμό, την αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική δράση, την ανοσιακή απόκριση, την κυτταρική απόπτωση καθώς και την πρωτεϊνσύνθεση σε επίπεδο εντέρου και β) στην αποσαφήνιση του τρόπου και του τόπου δράσης στο έντερο σημαντικών διατροφικών παραγόντων όπως το επίπεδο ενέργειας και πρωτεΐνης, η προσθήκη φυτικών βιοενεργών συστατικών καθώς και η κατανάλωση σιτηρεσίου που προδιαθέτει σε εντερική δυσβίωση παρουσία μυκοτοξινών.

1.1. Φυσιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων

Το όργανο με τη μεγαλύτερη σημασία για τη βέλτιστη εκμετάλλευση των θρεπτικών συστατικών ενός σιτηρεσίου είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων. Το ράμφος μαζεύει τροφή ενώ η διχαλωτή γλώσσα, που βρίσκεται στο οπίσθιο τμήμα του

ράμφους, χρησιμοποιείται για να υγρανθεί η τροφή. Στη συνέχεια, η τροφή περνά στον οισοφάγο, ο οποίος μεταφέρει την τροφή και το νερό. Ο οισοφάγος περιέχει βλεννογόνους αδένες που βοηθούν στη λίπανση και τη διέλευση της τροφής. Κατά τη διέλευση του από τον οισοφάγο, η τροφή μαλακώνει και υφίσταται προ-πέψη από ένζυμα όπως η πτυαλίνη, που υπάρχει στο σάλιο, και ένζυμα από άλλα όργανα, όπως οι τύποι αμυλάσης από το δωδεκαδάκτυλο και τον αδενώδη στόμαχο. Η τροφή περνά στον αδενώδη στόμαχο και περιβάλλεται με γαστρικό υγρό, υδροχλωρικό οξύ και πεπτικά ένζυμα, ξεκινώντας τη διαδικασία της διάσπασης των θρεπτικών συστατικών. Το ένζυμο πεψίνη εκτελεί τις πρωτεολυτικές του δραστηριότητες στον αδενώδη στόμαχο. Το στομάχι, γνωστό και ως το μασητικό όργανο στα ορνίθια, συσσωρεύει αδιάλυτους κόκκους, οι οποίοι αλέθονται με συχνές και επαναλαμβανόμενες συσπάσεις που ασκούν τεράστια πίεση, σπάζοντας τους κόκκους σε μικρά σωματίδια και αναμειγνύοντάς τους με τα υγρά από τον αδενώδη στόμαχο. Από το στομάχι, η τροφή περνά στο λεπτό έντερο, ένα όργανο που διακρίνεται ιστολογικά από την παρουσία λαχνών, οι οποίες ολοκληρώνουν την πέψη των πρωτεϊνών μέσω της έκκρισης εντερικών υγρών και πεπτικών ενζύμων όπως η αμινοπεπτιδάση, η αμυλάση, η μαλτάση και η ινβερτάση. Μια άλλη λειτουργία είναι η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών στα τρόφιμα που έχουν υποστεί πέψη, έτσι ώστε να μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος. Τέλος, το λεπτό έντερο παρέχει περισταλτική δράση που διοχετεύει άπεπτα υλικά στα τυφλά. Το πάγκρεας είναι το όργανο που εκκρίνει υγρό εμπλουτισμένο με αμυλάσες, θρυψίνη, λιπάσες και καρβοξυπεπτιδάσες. Το συκώτι εκκρίνει τη χολή στο δωδεκαδάκτυλο, το οποίο βοηθά στη διάσπαση των λιπών (Clavijo and Florez, 2017). Το λεπτό έντερο διαχωρίζεται σε τρία τμήματα (δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα, ειλεό) ενώ το παχύ έντερο περιλαμβάνει τα δύο τυφλά και το κόλον. Παράλληλα, στα τυφλά συμβαίνουν σημαντικές λειτουργίες με σκοπό τη μικροβιακή πέψη της κυτταρίνης καθώς και την απορρόφηση του νερού, ενώ για το κόλον το πιο χαρακτηριστικό είναι η αντιπερίσταλη, διαδικασία κατά την οποία γίνεται παλινδρόμηση ούρου προς τα τυφλά. Με αυτόν τον τρόπο, υπάρχει πρόσθετη πηγή νερού και πρόσθετη πηγή αζώτου για τη μικροχλωρίδα από το ουρικό οξύ (Reece and Rowe, 2017).

1.2. Εντερικό επιθήλιο ορνιθίων και μοριακά μονοπάτια

Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων απαρτίζεται από 4 στοιβάδες. Οι στιβάδες αυτές από μέσα προς τα έξω είναι ο βλεννογόσιος εντερικός φραγμός, ο εντερικός

υποβλεννογόنيος, ο μυϊκός χιτώνας και ο ορογόνοσ χιτώνας. Ο βλεννογόنيος εντερικός φραγμόσ αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα βλέννας, εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, τισ πρωτείνεσ στενούσ συνδέσμου (TJs) και το χόριο του υποβλεννογόνου (lamina propria) (Proszkowiec-Weglarz et al., 2020).

Το στρώμα βλέννεσ χωρίζεται σε ένα εξωτερικό στρώμα που συνδέεται με βακτήρια και προσδένεται χαλαρά με το επιθήλιο, ενώ το εσωτερικό στρώμα χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση IgA και βλεννίνεσ και προσκολλάται στο επιθήλιο. Ο βλεννογόνοσ σχηματίζει ένα πρώτο προστατευτικό στρώμα του εντερικού επιθηλίου που αποτρέπει τισ βλάβεσ και τα παθογόνα, χρησιμεύει ωσ υπόστρωμα για τη σταθεροποίηση των βακτηρίων, παρέχει ένα κατάλληλο περιβάλλον για τα ένζυμα και διευκολύνει την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (Nigam and Williams, 2019). Ο βλεννογόνοσ σχηματίζει κυκλικέσ πτυχέσ με σκοπό την αύξηση της επιφάνειασ επαφήσ του χυμού και του επιθηλίου και οι οποίεσ καλύπτονται από λάχνεσ και αυτέσ με τη σειρά τουσ καλύπτονται από μικρολάχνεσ. Μεταξύ των λαχών υπάρχουν χαρακτηριστικέσ καταδύσεισ που ονομάζονται κρύπτεσ του Lieberkuhn. Τα κύτταρα από τισ κρύπτεσ λόγω μιτωτικών διαιρέσειων ανανεώνονται συνεχώσ με σκοπό να ανανεώσουν τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα τισ λάχνεσ. Όταν τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν τισ λάχνεσ διαφοροποιούνται σε κυλινδρικά, καλυκοειδή, εντεροενδοκρινή και κύτταρα του Paneth. Τα κυλινδρικά κύτταρα λειτουργούν ωσ «φορέασ» ενζύμων και αποικοδομούν πρωτείνεσ, υδατάνθρακεσ και λιπίδια. Παράλληλα, στην επιφάνεια των μικρολαχών υπάρχει ο γλυκοκάλυκασ που απαρτίζεται από βλεννοπρωτείνεσ. Η πέψη και η απορρόφηση επηρεάζεται σημαντικά από αυτόν καθώσ παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και προσκόλληση της μικροβιακήσ χλωρίδασ (Reece and Rowe, 2017).

Τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την πέψη, την απορρόφηση και την αναγνώριση παθογόνων μέσω της έκφρασησ των TLRs, καθώσ και της απελευθέρωσησ αντιμικροβιακών πεπτιδίων και της έκκρισησ ορμονών, νευροδιαβιβαστών, κυτοκινών και χημειοκινών. Παρόλο που η γνώση των χαρακτηριστικών του εντερικού επιθηλίου των ορνιθίων είναι περιορισμένη, πρόσφατη έρευνα διαπίστωσε ότι το επιθήλιο του λεπτού εντέρου των ορνιθίων έχει κάποιεσ ομοιότητεσ, αν και διαφέρει σημαντικά από τον άνθρωπο και τα ποντίκια και έχει μοναδικά χαρακτηριστικά. Επομένωσ, είναι κρίσιμο να κατανοηθούν ενδελεχώσ τα χαρακτηριστικά του επιθηλίου του λεπτού εντέρου των ορνιθίων (Zhang et al., 2019).

Για την κατανόηση των χαρακτηριστικών του εντερικού επιθηλίου των ορνιθίων υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί δράσης που σχετίζονται με τα λεγόμενα μοριακά μονοπάτια και τις αλληλεπιδράσεις τους. Μερικά από τα βασικά μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται σε μηχανισμούς δράσης που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία είναι τα μονοπάτια του εντερικού φραγμού, της αποτοξίνωσης, της αντιοξειδωτικής απόκρισης, της ανοσιακής απόκρισης, της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού καθώς και της κυτταρικής απόπτωσης.

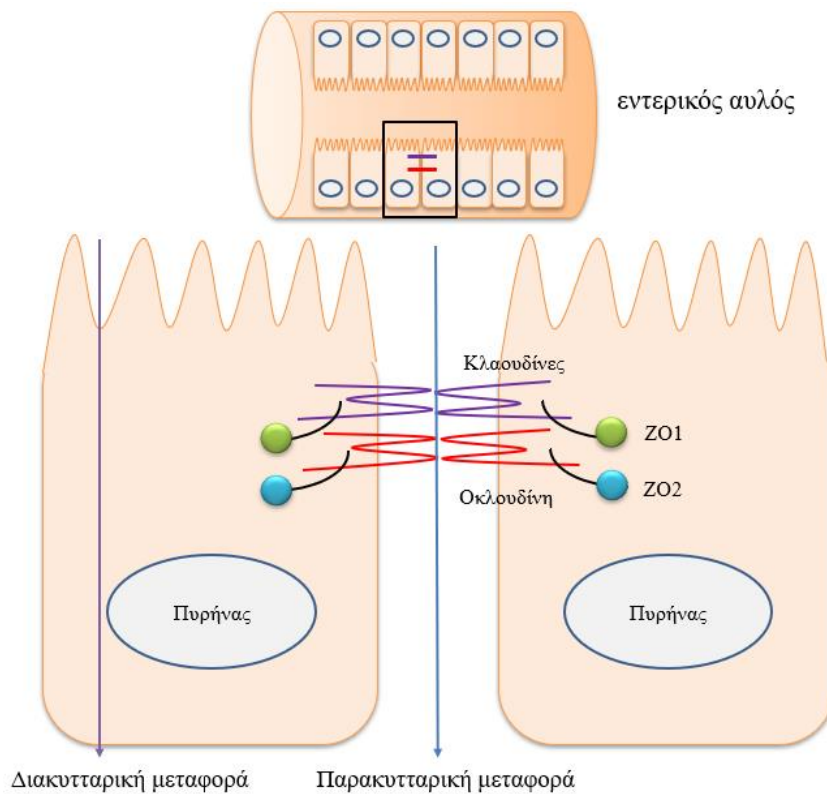
1.2.1. Εντερικός φραγμός-Πρωτεΐνες στενού συνδέσμου (Tight junctions-TJ)

Τα κύτταρα του εντερικού φραγμού συνδέονται μεταξύ τους πολύ στέρεα στις πλαγιο-βασικές τους επιφάνειες με τις πρωτεΐνες στενού συνδέσμου. Οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου είναι σύμπλοκα πολλαπλών πρωτεϊνών που σφραγίζουν τον παρακυτταρικό χώρο μεταξύ γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων και ρυθμίζουν τη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού (Reece and Rowe, 2017). Οι σύνδεσμοι αυτοί ανοίγουν και κλείνουν όταν εκτίθενται σε μια σειρά ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών ουσιών, των διαδικασιών απορρόφησης, διαφόρων κυτταρικών οδών και φλεγμονωδών μεσολαβητών (**Σχήμα 3**). Οι πρωτεΐνες στενού συνδέσμου απαρτίζονται από τις ζονουλίνες 1 και 2 (ZO-1, ZO-2), τις οκλουδίνες (OCLN) και τις κλαουδίνες (CLDN). Οι οκλουδίνες και οι κλαουδίνες είναι οι κύριες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην παρακυτταρική σφράγιση ενώ τα ZO-1 και ZO-2 χρησιμεύουν ως πρωτεΐνες κυτταροπλασματικής πλάκας που αλληλοεπιδρούν τόσο με τις διαμεμβρανικές όσο και με τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (Proszkowiec-Weglarz et al., 2020).

Οι πρωτεΐνες ZO, που περιλαμβάνουν ZO-1, -2 και -3, είναι περιφερειακές πρωτεΐνες που εντοπίζονται σε θέσεις σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες ZO ενεργοποιούν διάφορους τύπους πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της ένωσης, συμβάλλοντας έτσι στη λεγόμενη «συνδετική πλάκα». Επιπλέον, έχουν έναν γενικό ρόλο στη διακυτταρική προσκόλληση και επικοινωνία καθώς φέρουν ορισμένες περιοχές που απαιτούνται για τη δομική οργάνωση συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων και πρόσθετες περιοχές ικανές να εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης. Η πιο σημαντική λειτουργία των πρωτεϊνών ZO στη θέση σύνδεσης είναι η ρύθμιση του πολυμερισμού κλαουδίνης στα επιθηλιακά κύτταρα, η οποία αποδείχθηκε με τη χρήση μιας αντίστροφης γενετικής προσέγγισης (Bauer et al., 2010).

Παράλληλα, οι οκλουδίνη είναι μια πρωτογενής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές, δύο εξωκυτταρικούς βρόχους και τρεις κυτταροπλασματικές περιοχές. Η OCLN δρα ως παρακυτταρικός φραγμός, διατηρεί την πολικότητα της κυτταρικής επιφάνειας μέσω αλληλεπίδρασης με το ZO-1 και ρυθμίζει τη διαπερατότητα των επιθηλιακών κυττάρων. Έκφραση αυτής της πρωτεΐνης έχει αναφερθεί σε πολλά όργανα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, των όρχεων, της επιδιδυμίδας, των νεφρών, του ήπατος, του πνεύμονα, του στομάχου, του δωδεκαδακτύλου, του ειλεού, του παχέος εντέρου, του δέρματος και των αιμοφόρων αγγείων (Ahn et al., 2016).

Τέλος, οι κλαουδίνες είναι μια πολυγονιδιακή διαμεμβρανική πρωτεϊνική οικογένεια που περιλαμβάνει τουλάχιστον 27 μέλη. Στο γαστρεντερικό σωλήνα, οι κλαουδίνες εντοπίζονται κυρίως στο εντερικό επιθήλιο. Η δυσλειτουργία των κλαουδινών μπορεί να συμβάλει σε διαταραχή επιθηλιακής διείσδυσης και πολλαπλές ασθένειες του εντέρου (Zhu et al., 2019).



Σχήμα 3. Οι μοριακοί βιοδείκτες του στενού συνδέσμου και η φυσιολογική τους σημασία στη μεταφορά ουσιών μέσω της παρακυτταρικής μεταφοράς.

1.2.2. Αποτοξίνωση (AHR μονοπάτι)

Τα ορνίθια σε συνθήκες εντατικής εκτροφής μπορεί να εκτεθούν σε μια σειρά από παράγοντες καταπόνησης ενδογενούς (π.χ. μεταβολικής) και εξωγενούς - περιβαλλοντικής (π.χ. θερμοκρασία, δίαιτα και ξеноβιοτικά) προέλευσης. Κάθε φορά που η κυτταρική συγκέντρωση των προοξειδωτικών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) υπερβαίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πτηνού, θα μπορούσε να συμβεί απορρύθμιση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Stefanson and Bakovic, 2014). Μια τέτοια κατάσταση εάν δεν ελεγχθεί έγκαιρα και επαρκώς θα οδηγήσει σε οξειδωτική καταπόνηση. Το τελευταίο θα οδηγήσει με τη σειρά του σε οξείδωση κυτταρικών πρωτεϊνών και υπεροξείδωση λιπιδίων, βλάβη του DNA και φλεγμονή με επιζήμια αποτελέσματα για την απόδοση των ορνιθίων, την υγεία και την ποιότητα του προϊόντος (Sahin et al., 2013; Lee et al., 2016; Da Silva et al., 2018; Bortoli et al., 2018; Carvalho et al., 2019).

Τα ορνίθια μπορεί να αντισταθούν στην οξειδωτική καταπόνηση μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Ο άμεσος μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση δέσμευση

διατροφικών μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών ενώσεων όπως βιταμίνες, φυτοχημικά, ιχθυοστοιχεία (Allen and Tresini, 2000; Lee et al., 2016). Ο έμμεσος μηχανισμός περιλαμβάνει τη γονιδιακή έκφραση κυτταροπροστατευτικών ενζύμων με αποτοξινωτικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες (Köhle and Bock, 2006; Wullaert et al., 2011; Huang et al., 2015).

Η υγεία των ζώων και των ανθρώπων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα του σώματος να ελέγχει, να αποτοξινώνει και να διαχειρίζεται την οξειδωτική καταπόνηση (Pizzino et al., 2017). Τα ζώα εκτίθενται καθημερινά σε μεγάλο αριθμό ξενοβιοτικών ουσιών μέσω του αέρα, του νερού και της τροφής. Ξενοβιοτικές ουσίες θεωρούνται μυκοτοξίνες, φάρμακα, διοξίνες καθώς και παθογόνα (Patterson et al., 2010). Η αποτοξίνωση αυτών των ξενοβιοτικών ουσιών υποστηρίζεται κυρίως από μεταγραφικούς παράγοντες που ονομάζονται υποδοχείς αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhRs; Chiba et al., 2011).

Οι παράγοντες μεταγραφής είναι πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από βιολογικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης για το σώμα προκειμένου να ρυθμίσουν τη μεταφορά γενετικής πληροφορίας αυξάνοντας την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στις οδούς σηματοδότησης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα AhRs είναι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες για την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών ουσιών. Αυτή η ρύθμιση στα κύτταρα σχετίζεται με την μη αναστρέψιμη δέσμευσή τους με τους υποδοχείς υδρογονάνθρακα αρυλίου AhR1 και AhR2 (Bak et al., 2017). Το AhR1 ανιχνεύεται σε θηλαστικά ενώ το AhR2 έχει ανιχνευθεί σε θηλαστικά, πτηνά, ψάρια και ποντίκια (Yasui et al., 2007).

Τα AhR δομούν ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα με δύο πρωτεΐνες θερμικού σοκ 90 (Hsp90), μια πρωτεΐνη του ιού X της ηπατίτιδας B (XAP2) και μια πρωτεΐνη p23 σε ανενεργή κατάσταση (Wang et al., 2020b). Σε επαγόμενη κατάσταση, οι προσδέτες συνδέονται με τα AhRs και μεταφέρονται στον πυρήνα. Μετά τη δέσμευση με τον πυρηνικό μετατοπιστή AHR (ARNT) σχηματίζουν ένα ενεργό ετεροδιμερές το οποίο προσαρμόζει την έκφραση των γονιδίων προσκολλώντας στο λεγόμενο ξενοβιοτικό αποκρινόμενο στοιχείο (XRE, **Σχήμα 4**).

Το σύμπλεγμα AHRs-ARNTs ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων όπως η οξειδοορεδοουκτάση της κινόνης 1 (NQO1), η τρανσφεράση της γλουταθειόνης A2 (GSTA2) και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1). Το

κυτόχρωμα P450 είναι μια οικογένεια ενζύμων που εμπλέκονται στον οξειδωτικό μεταβολισμό των φαρμάκων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ένταση, τη διάρκεια δράσης τους και συνεπώς στην αποτοξίνωση του οργανισμού (Banerjee and Ghosh, 2016).

Οι πρώτοι προσδέτες AHR ανακαλύφθηκαν στα μέσα του 1800 και ονομάστηκαν ξενοβιοτικά. Ο ξενοβιοτικός μεταβολισμός κατανέμεται σε τρεις φάσεις. Στη φάση I, τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) επάγονται από τα ξενοβιοτικά. Στη φάση II, αυτά τα ξενοβιοτικά συνδυάζονται με ανταγωνιστικά συστατικά για να δημιουργήσουν αντιδράσεις που καταλύονται από την S τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Στη συνέχεια, εάν δεν εξαλειφθούν από τα κύτταρα, μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία στη φάση III. Αυτή είναι η διαδικασία του οργανισμού για την εξάλειψη των ξενοβιοτικών (Patel & Sen, 2013).

Οι πιο συνηθισμένοι προσδέτες (ligands) AHR είναι η 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-π-διοξίνη (TCDD) και οι αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις (HAs) που είναι οργανικοί ρύποι και υπάρχουν ως σύμπλοκα *in vivo*. Επάγουν την έκφραση του κυτοχρώματος P4501A1 (CYP1A1) και οι τοξικότητες είναι διαφορετικές ανάλογα με τον προσδέτη. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης προσδέτες AhR που προάγουν την υγεία όπως τα φυτοχημικά που αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση στο μονοπάτι AHR (Safe et al., 2020).

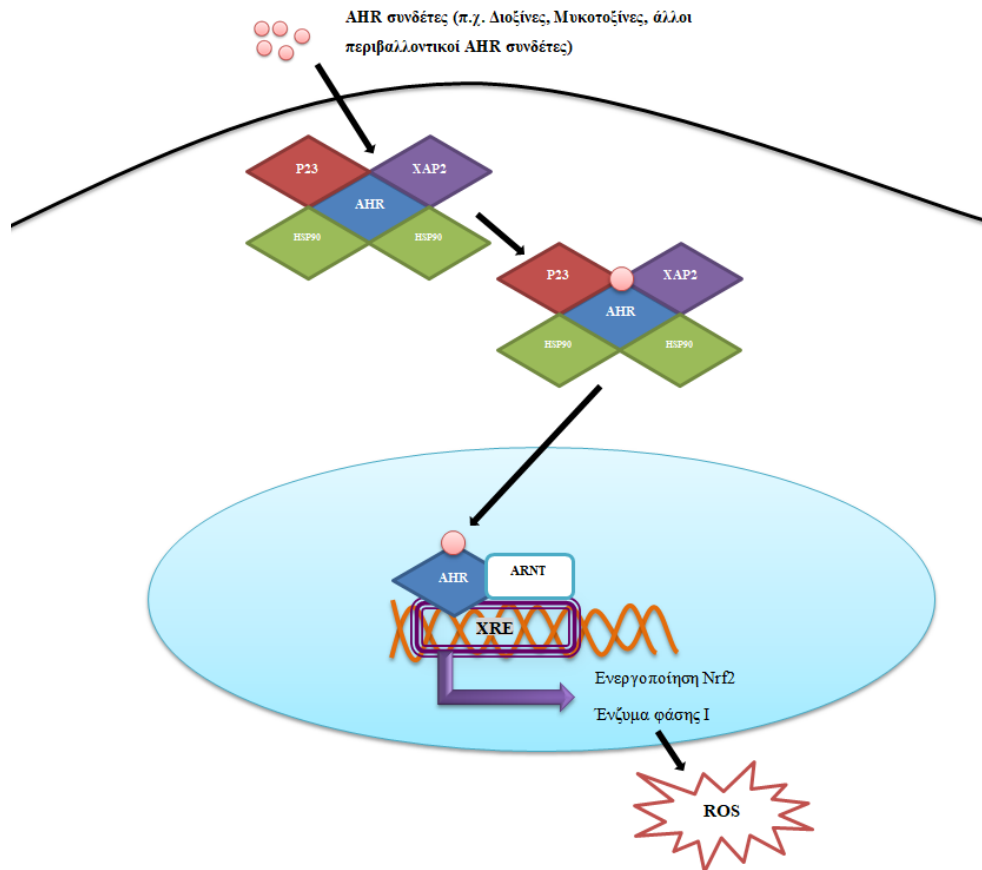
Το κυτόχρωμα P450 (CYP) είναι μια αιμοπρωτεΐνη που έχει βασικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών που λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, στο έντερο, στους πνεύμονες, στα νεφρά και στο πλάσμα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ενεργοποίηση του AHR ρυθμίζει και αυξάνει τη μεταγραφή της οικογένειας ενζύμων του κυτοχρώματος P450 1 (CYP1s).

Το ένζυμο CYP1A1 είναι το πιο δραστικό μεταξύ της οικογένειας των CYP στην αφομοίωση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Επί του παρόντος, το CYP1A1 επιλέχθηκε ως ένα πολλά υποσχόμενο ένζυμο στην πρόληψη και τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών (Ye et al., 2019). Το CYP1A2, το οποίο είναι ένα κρίσιμο κυτόχρωμα P450 για τον άνθρωπο, περιέχεται σε πολλά είδη όπως φάρμακα, βιομηχανικές χημικές ουσίες και περιβαλλοντικές τοξικές ουσίες. Λόγω του γενετικού πολυμορφισμού και των περιβαλλοντικών παραγόντων, η δράση του ενζύμου αλλάζει μεταξύ των ειδών (Karelyukh et al., 2019). Επιπλέον, το CYP1B1 διαδραματίζει ένα

κρίσιμο ρόλο στον οξειδωτικό μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Μεταβολίζει χημικά μέρη της ρετινόλης στον αμφιβληστροειδή, καταλύει την υδροξυλίωση της μελατονίνης, μεταβολίζει τα διαιτητικά φυτικά φλαβονοειδή και συνθέτει τα γονιδιοτοξικά οιστρογόνα της κατεχόλης (Shah et al., 2019).

Τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους είναι οργανικές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος (< 900 daltons) που μπορεί να ξεκινήσουν μια βιολογική διεργασία. Είναι συνήθως θρεπτικά συστατικά, ορμόνες, βιταμίνες, δηλητήρια, μπαχαρικά, αρωματικά, αντιοξειδωτικά, φάρμακα και πρόδρομες ουσίες βιοπολυμερών. (Hadacek and Bachmann, 2015).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μονοπάτι AHR ενεργοποιείται από προσδέτες. Συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους παρέχουν στους οργανισμούς περίσσεια προσδετών για την ενεργοποίηση ή όχι του μονοπατιού AHR. Για παράδειγμα, ο Jeuken και οι συνεργάτες του το 2003 εξέτασαν την ενεργοποίηση του μονοπατιού AHR από φυτικά συμπληρώματα, λαχανικά και φρούτα όπως ginseng, γλυκόριζα, ginkgo biloba, καλαμπόκι, πιπέρι jalapeno. Παρατήρησαν σημαντική διέγερση της έκφρασης του γονιδίου AhR έως και 60% στα ανθρώπινα κύτταρα, in vitro. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα διατροφικά συστατικά μπορεί να είναι ένα κρίσιμο απόθεμα φυσικών συνδετών AhR (Jeuken et al., 2003). Εν τω μεταξύ, ερευνητές φυτών ανέφεραν ότι ο γενετικά μετασχηματισμένος καπνός προκειμένου να εκφράσει το κυτόχρωμα P450 των θηλαστικών «απορρόφησε» μεγάλη ποσότητα πτητικών οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους από τα χωράφια (James et al., 2008). Επιπλέον, το 2020 ο Manzella και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν νέα στοιχεία ότι η ορμόνη σεροτονίνη θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητα των προσδετών AhR να ενεργοποιούν τον υποδοχέα AHR στο έντερο (Manzella et al., 2020).



Σχήμα 4. Μοριακό μονοπάτι AHR. Σε ανενεργή κατάσταση το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελείται από 2 πρωτεΐνες θερμικού σοκ 90 (Hsp90), την πρωτεΐνη X που σχετίζεται με τον ιό της ηπατίτιδας B (XAP2) και την πρωτεΐνη p23. Σε κατάσταση επαγωγής, οι συνδέτες AHR όπως για παράδειγμα οι μυκοτοξίνες, τα φυτοχημικά και τα βακτηριακά παθογόνα συνδέονται με τα AHR και μεταφέρονται στον πυρήνα. Μετά τη δέσμευση με τον ARNT, διαμορφώνουν ένα ενεργό ετεροδιμερές που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων προσκολλώντας στο στοιχείο ξενοβιοτικής απόκρισης (XRE). Συγκεκριμένα, το σύμπλεγμα AHR-ARNT συνδέεται με το XRE και ρυθμίζει την έκφραση ενζύμων όπως η οξειδοαναγωγή της κινόνης 1 (NQO1), η μεταφορά της γλουταθειόνης A2 (GSTA2) και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) (CYP1A2, CYP1A1, CYP1B1).

1.2.3. Αντιοξειδωτική απόκριση (*Nrf2* μονοπάτι)

Η οξειδωτική καταπόνηση είναι γενετικά μια βιοχημική δυσλειτουργία της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος. Παράλληλα, η φλεγμονή είναι η βιολογική αντίδραση στο οξειδωτικό στρες, όπου το κύτταρο πυροδοτεί τη συγκέντρωση πρωτεϊνών, ενζύμων και άλλων ενώσεων για να διατηρήσει την ομοιόσταση (Stefanson and Bakovic, 2014). Ο έλεγχος της φλεγμονής είναι κρίσιμος για τη διασφάλιση μιας ισορροπημένης ανοσολογικής απόκρισης χωρίς την προώθηση της χρόνιας φλεγμονής. Ένας από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές της αντιοξειδωτικής απόκρισης και της φλεγμονής είναι ο μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας Nrf2 (Nrf2; Vomund et al., 2017).

Αρκετοί ερευνητές του γονιδιώματος τις τελευταίες δεκαετίες εξερευνούν γονίδια στόχους του Nrf2 και προσδιόρισαν έναν αριθμό γονιδίων που φέρουν την αλληλουχία ARE και σχετίζονται με τη ρύθμιση της οξειδωτικής ομοιόστασης. Υπό κανονικές συνθήκες, το Nrf2 περιορίζεται από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Keap1 (πρωτεΐνη που προέρχεται από ερυθροειδή κύτταρα τύπου Kelch). Το σύμπλεγμα Nrf2-Keap1 έχει μια εξαρτημένη πρωτεωμική δομή και ο Nrf2 απελευθερώνεται μέσω προσαρμογής κρίσιμων κυστεϊνών στα Keap1 και Nrf2 (Ma, 2013).

Το 1994, οι Moί και οι συνάδελφοί του ανακάλυψαν έναν νέο βασικό μεταγραφικό παράγοντα που ονομάζεται Nuclear Factor erythroid 2-related (Nrf2), ένας κρίσιμος παράγοντας μεταγραφής ευαίσθητος στην οξειδοαναγωγή για όλα τα θηλαστικά (Moί et al., 1994). Το Nrf2 ετεροδιμερίζεται με μικρές πρωτεΐνες Maf στον πυρήνα και αυτό το σύμπλεγμα μπορεί στη συνέχεια να προσαρτηθεί στο αντιοξειδωτικό (ηλεκτρόφιλο) στοιχείο απόκρισης (ARE, **Σχήμα 5**). Το ARE μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή των γονιδίων που αποκρίνονται στο ARE (Ahmed et al., 2017).

Η διέγερση του Nrf2 οδηγεί σε μια αύξηση ενός αριθμού πρωτεϊνών φάσης 2 και αντιοξειδωτικών ενζύμων ικανών να αποτρέψουν τη χρόνια οξειδωτική καταπόνηση, να αυξήσουν τον μεταβολισμό των τοξινών και να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση (Bocci and Valacchi, 2015). Τα γονίδια στόχοι του Nrf2 που είναι τα πιο προστατευτικά και κρίσιμα για τη μείωση των ROS θα συνοψιστούν παρακάτω.

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα πεπτίδιο θειόλης τριών αμινοξέων που είναι χωρίς αμφιβολία η πιο επαρκής ενδοκυτταρική αντιοξειδωτική πρωτεΐνη που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα αντιοξειδωτικό

ένζυμο που περιέχει σελήνιο και μειώνει το H_2O_2 και οξειδώνει τα λιπίδια σε νερό και λιπιδικές αλκοόλες. Επιπλέον, οξειδώνει τη γλουταθειόνη σε δισουλφίδιο γλουταθειόνης (Stefanson and Bakovic, 2014).

Η ρύθμιση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων εξαρτάται από τις χαμηλές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης επειδή συνεισφέρει ισοδύναμα για μια μεγάλη ποσότητα βιοχημικών μονοπατιών. Εάν η δραστηριότητα GPx ή τα επίπεδα GSH είναι ανεπαρκή, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων δεν αποτοξινώνονται και μπορούν να μετατραπούν σε ρίζες ελεύθερου οξυγόνου και λιπιδικές ρίζες υπεροξυλίου. Στο οξειδωτικό στρες χαμηλού επιπέδου, το σύστημα γλουταθειόνης θεωρείται ότι είναι μια κρίσιμη άμυνα. Εν τω μεταξύ, η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της παροχής μειωμένης γλουταθειόνης (Couto et al., 2016).

Τελευταία αλλά εξίσου σημαντική είναι η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST) είναι ένα μεταβολικό ένζυμο φάσης II που διατηρεί την ικανότητα να φτιάχνει την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) σε ξеноβιοτικές ενώσεις. Τα GST έχουν πολυάριθμους βιολογικούς ρόλους, όπως η προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες και αρκετά τοξικά μόρια. Ως αποτέλεσμα, η αύξηση των μεταλλάξεων του DNA ή η βλάβη του DNA που διεγείρει την καρκινογένεση μπορεί να αποτραπεί με την επαγωγή GST (Vaish et al., 2020).

Η καταλάση (CAT) καταλύει την τροποποίηση δύο μορίων υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δύο μόρια νερού και ένα μόριο οξυγόνου σε μια αντίδραση διάσπασης που μπορεί να αποφύγει τη σύνθεση ριζών υδροξυλίου από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Jung and Kwak, 2010). Επιπλέον, οι δισμουτάσες υπεροξειδίου (SODs) οργανώνουν την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Αυτά τα ένζυμα ενεργοποιούν τη διάσπαση της ελεύθερης ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου (O_2^-) σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και μειώνουν το επίπεδο O_2 που τραυματίζει τα κύτταρα σε υπερβολική συγκέντρωση (Younus, 2018).

Όπως υποδηλώνει το όνομά τους, οι οξειδοαναγωγάσες NAD(P)H:κινόνης (NQO's), είναι ικανές να μειώνουν τις ενδογενείς και εξωγενείς κινόνες σε υδροκινόνες. Συγκεκριμένα, το NQO1 είναι σε θέση να μειώνει την ουβικινόνη και την κινόνη της βιταμίνης E σε αντιοξειδωτικές μορφές και μπορεί να μειώσει το υπεροξειδίο αμέσως,

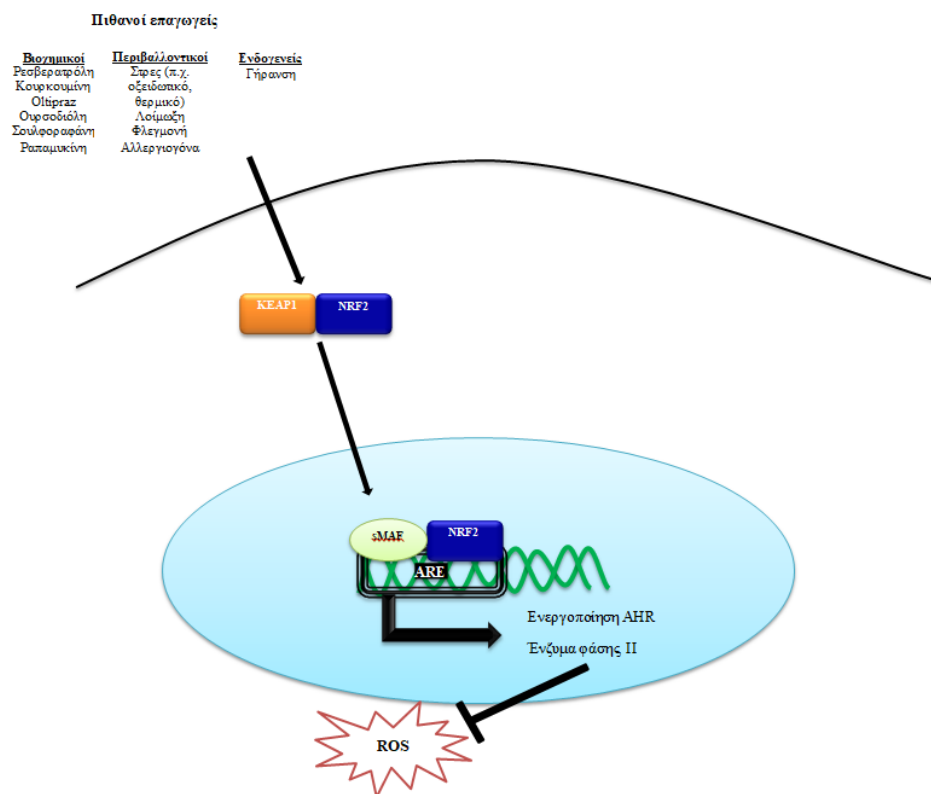
γεγονός που υποδηλώνει έναν κυρίαρχο προστατευτικό ρόλο. Επιπλέον, το πιο κρίσιμο χαρακτηριστικό του NQO1 είναι ότι είναι εξαιρετικά επαγόμενο από πολλούς τύπους καταπόνησης (Ross and Siegel, 2017). Από την άλλη πλευρά, η οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1) είναι ένα επαγόμενο ένζυμο που ενεργοποιεί την οξειδωτική αποικοδόμηση της κυτταρικής αίμης για την απελευθέρωση του ελεύθερου σιδήρου, του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και της μπιλιβερδίνης. Λόγω των αποκρίσεων της μπιλιβερδίνης και του CO, το HO-1 εμφανίζει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες. Κατά τη διάρκεια διαφορετικών καταστάσεων ασθένειας, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, το HO-1 ενεργοποιείται σε μεγάλο βαθμό (Chau, 2015).

Εν τω μεταξύ, το σύστημα θειορεδοξίνης (Trx) είναι ένα από τα πιο σημαντικά κυτταρικά αναγωγικά συστήματα δισουλφιδίου, συμπεριλαμβανομένων των NADPH, Trx reductase (TrxR) και Trx. Αυτό το σύστημα προσαρμόζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η γονιδιακή έκφραση, η αντιοξειδωτική απόκριση, η απόπτωση και ο πολλαπλασιασμός. Συγκεκριμένα, λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων για ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως οι υπεροξειρεδοξίνες και οι αναγωγάσες σουλφοξειδίου της μεθειονίνης, ρυθμίζει το έργο των μεταγραφικών παραγόντων όπως το NF-κB και σχετίζεται με την προσαρμογή της απόπτωσης (Muri et al., 2018). Οι υπεροξειρεδοξίνες (PRDXs) πιστεύεται ότι έχουν δυνατότητες να εξαλείψουν σταδιακά διάφορες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Το PRDX1 είναι ένα σημαντικό μέλος των αντιοξειδωτικών ενζύμων και μπορεί γρήγορα να υπεροξειδωθεί. Στον πυρήνα, το PRDX1 συνεργάζεται επακριβώς με το p53 ή με μεταγραφικούς παράγοντες όπως c-Myc, NF-κB και AhR, και με αυτόν τον τρόπο επηρεάζει τις επιδράσεις τους στη γονιδιακή ρύθμιση. Στο κυτταρόπλασμα αποκτά αντι-αποπτωτικό δυναμικό μέσω άμεσων ή έμμεσων αλληλεπιδράσεων με πολλούς εξαρτώμενους από το ROS (ρύθμιση οξειδοαναγωγής) τελεστές (Ding et al., 2017).

Το Keap1 προσδιορίστηκε ως μια νέα πρωτεΐνη δέσμευσης Nrf2 από το χειρισμό της ανασταλτικής περιοχής Neh2 του Nrf2 ως δόλωμα. Παρόμοια με το Nrf2, το Keap1 εκφράζεται ευρέως στους ιστούς και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Ma, 2013). Η ευθύνη του Keap1 ως αρνητικού καταστολέα του Nrf2 στοχεύει κυρίως στην εξαρτώμενη από το Keap1 ουβικουϊτινοποίηση του Nrf2. Το Keap1 παρέχει ως συστατικό προσαρμογής για τη λιγάση ουβικιτίνης E3 με βάση το Cul3 που είναι υπεύθυνη για την ουβικουϊτινοποίηση του Nrf2 (Lu et al., 2016). Ο τομέας Neh2 του Nrf2 περιέχει δύο μοτίβα σύνδεσης, που ονομάζονται ETGE και DLG, τα οποία

συνδέονται με τον τομέα DC του Keap1 με διαφορετικές συνδέσεις (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Υπό κανονικές συνθήκες, το σύμπλοκο Nrf2-Keap1 υπάρχει στο κυτταρόπλασμα με χρόνο ημιζωής περίπου 20 λεπτών επειδή, εάν δεν χρειάζεται, αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα (Bocci and Valacchi, 2015). Σε επαγόμενη κατάσταση, οι επαγωγείς ανταποκρίθηκαν με κυστεΐνες στο Keap1, αφήνοντας ελεύθερο το Nrf2, επιτρέποντας τη μετατόπιση στον πυρήνα και ενεργοποιώντας την έκφραση κυτταροπροστατευτικών και άλλων γονιδίων (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).



Σχήμα 5. Μοριακό μονοπάτι Nrf2. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη Keap1 και αφού αποδεσμεύεται λόγω επαγωγέων ενεργοποιεί ένζυμα φάσης II/αποτοξίνωσης μέσω του στοιχείου αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE). Αυτά τα γονίδια περιλαμβάνουν τη NAD(P)H: οξειδοαναγωγή της κινόνης 1 (NQO1), την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), την οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px), την καταλάση (CAT), τη δισμουτάση του υπεροξειδίου 1 (SOD1), την αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR) και το σύστημα θειορεδοξίνης/υπεροξειρεδοξίνης.

1.2.4. Ανοσιακή απόκριση (TLR μονοπάτι)

Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR) είναι η «περιπολία» του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Στα ορνίθια έχουν εντοπιστεί 4 κατηγορίες PRR, αλλά η κύρια κατηγορία είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) (Haunshi et al., 2017). Σήμερα, έχουν εντοπιστεί 11 TLR στον άνθρωπο, 13 TLR στα ποντίκια και 10 TLR στα πτηνά. Τα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με το παθογόνο (PAMPs) που προέρχονται από διάφορους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών, των πρωτόζωων και των μυκήτων αναγνωρίζονται από τα TLR (Kawai and Akira, 2007; Jie et al., 2013).

Τα ανοσοκύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα μακροφάγα, ομοίως και τα μη ανοσοκύτταρα όπως τα κύτταρα ινοβλαστών και τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν TLRs. Ταξινομούνται σε δύο υποοικογένειες ανάλογα με τη θέση τους στο κύτταρο. Οι TLRs της κυτταρικής επιφάνειας (π.χ. *TLR2*, *TLR4*) και οι ενδοκυττάριοι TLRs (π.χ. *TLR3*). Οι TLRs της κυτταρικής επιφάνειας εντοπίζουν ως επί το πλείστον στοιχεία μικροβιακής μεμβράνης όπως λιπίδια, λιποπρωτεΐνες και πρωτεΐνες, ενώ οι ενδοκυττάριοι TLRs αναγνωρίζουν νουκλεϊκά οξέα που προέρχονται από βακτήρια και ιούς, καθώς και αυτο-νουκλεϊκά οξέα στην περίπτωση ασθενειών όπως των αυτοάνοσων νοσημάτων (Kawasaki and Kawai, 2014).

Γενικά, και οι δύο υποοικογένειες των TLR πυροδοτούν την έμφυτη ανοσία. Κατηγοριοποιούνται επίσης από την εξάρτησή τους ή όχι από τον μεταγραφικό παράγοντα MyD88 είτε από την εξάρτησή τους από τον μεταγραφικό παράγοντα TRIF. Λόγω της ενεργοποίησης του MyD88 ή/και του TRIF, συντάσσονται διάφορα μόρια προσαρμογής για να ενεργοποιήσουν ορισμένους μεταγραφικούς παράγοντες που στη συνέχεια προάγουν την παραγωγή κυτοκίνης (π.χ. IL-6) και χημειοκίνης (π.χ. IL-8) (Lu et al., 2009).

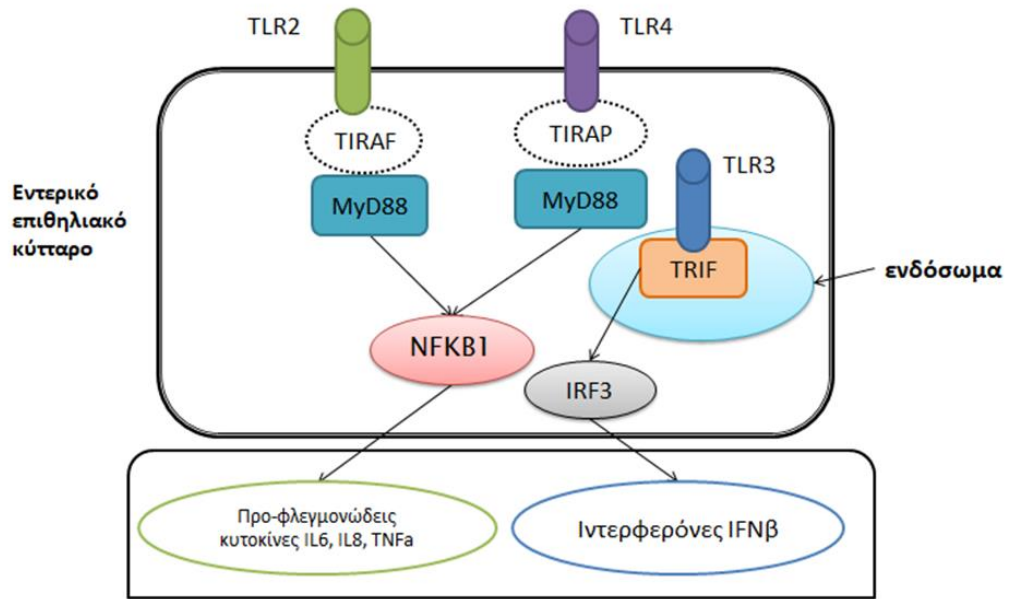
Υπάρχουν τουλάχιστον 8 ομόλογοι TLR ορνιθίων και θηλαστικών μέχρι σήμερα: *TLR2* (τύπος 1 και 2), *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *TLR16*, *TLR21* (Abasht et al., 2008).

Τα Gram αρνητικά, τα θετικά κατά Gram βακτήρια και τα μυκοπλάσματα αποκτούν ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων όπως λιποπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια που αναγνωρίζονται από το *TLR2* (Abasht et al., 2008). Το σύμπλεγμα *TLR2/TLR1* και *TLR2/TLR6* θηλαστικών συνδέει τρι-ακυλιωμένα και δι-ακυλιωμένα πεπτίδια που οδηγεί σε διέγερση της οδού σηματοδότησης MyD88. Στα ορνίθια, το

TLR2i1 και το *TLR2i2* σε συνεργασία με το *TLR1LA* ή το *TLR1LB* δρουν ως απόκριση σε δι- και/ή τρι-ακυλιωμένα λιποπεπτίδια προκειμένου να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι σηματοδότησης *MyD88* (Keestra et al., 2013).

Παράλληλα, ο *TLR3* είναι ένας σημαντικός υποδοχέας αναγνώρισης για το dsRNA που προέρχεται από ιούς, επομένως είναι η κύρια απόκριση στην ιογενή μόλυνση. Επιπλέον, ένας από τους πιο σημαντικούς ρόλους του *TLR3* πιστεύεται ότι είναι η επαγωγή της αντιϊκής κυτοκίνης IFN-beta κατά τη διάρκεια λοιμώξεων μέσω της ανεξάρτητης οδού *MyD88* (TRIF σηματοδοτικό μονοπάτι, **Σχήμα 6**). Τα αποτελέσματα των Karpala και των συναδέλφων του το 2008 αποδεικνύουν ότι το *TLR3* των ορνιθίων, όπως και το *TLR3* των θηλαστικών, είναι ένα γονίδιο που διεγείρεται από την IFN καθώς ενεργοποιήθηκε εύκολα τόσο από τον *IFNa* όσο και από τον *IFNb*, ενώ η *IL6* δεν επηρέασε την έκφραση του *TLR3* (Karpala et al., 2008).

Επιπλέον, το γονίδιο *TLR4* των ορνιθίων είναι βασικό για την αναγνώριση των λιποσακχαριτών (LPS) των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων. Το *TLR4* των θηλαστικών ενεργοποιεί τόσο τα μονοπάτια σηματοδότησης *MyD88* όσο και *TRIF*, ενώ το *TLR4* των ορνιθίων δεν ακολουθεί το μονοπάτι σηματοδότησης *TRIF* πιθανώς λόγω της έλλειψης ορθολόγου της πρωτεΐνης προσαρμογέα TRAM. Το μονοπάτι σηματοδότησης *MyD88* περιλαμβάνει τα γονίδια *MyD88*, *NF-κB*, τον παράγοντα *TNF-α* που ενεργοποιείται από τα LPS (Li et al., 2017).



Σχήμα 6. Μοριακό μονοπάτι TLRs. Η σηματοδότηση όλων των TLRs εκτός του TLR3 γίνεται μέσω του προσαρμογέα MyD88 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NFKB1 και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Το μονοπάτι σηματοδότησης TLR3 χρησιμοποιεί το TRIF με αποτέλεσμα την μετατόπιση του IRF3 στον πυρήνα και την πρόκληση της έκφρασης του IFNβ.

Στον παρακάτω Πίνακα (1.1) παρουσιάζονται μερικές επιδράσεις στο TLR μονοπάτι είτε με την προσθήκη κάποιου πρόσθετου στο σιτηρέσιο είτε με την πρόκληση κάποιας καταπόνησης σε ορνίθια κρεοπαραγωγής.

Πίνακας 1.1. Επιδράσεις στο μονοπάτι TLR σε ορνίθια κρεοπαραγωγής ανάλογα με το πρόσθετο ή/και την πρόκληση καταπόνησης που πραγματοποιήθηκε.

Πρόσθετο/πρόκληση		Επίδραση	Όργανο επίδρασης	Βιβλιογραφία
Προβιοτικό και αντιβιοτικό	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και χλωροτετρακυκλίνη	↑ TLR2 ↑ TLR4	Νήστιδα ορνιθίων	Bai et al., 2013
Προβιοτικό και νεκρωτική εντερίτιδα (NE)	<i>Lactobacillus fermentum</i> και <i>Clostridium perfringens</i>	↑ TLR2 σε ορνίθια με νεκρωτική εντερίτιδα ↓ TLR2 στις επεμβάσεις του προβιοτικού	Επιθήλιο του ειλεού ορνιθίων	Cao et al., 2012
Παθογόνο βακτήριο	Λιποπολυσακχαρίτης (LPS)	↑ TLR4 ↑ IL-1β ↑ IL-8 (20 µg/mL LPS)	Καλλιέργεια των μικροοργανισμών του ειλεού ορνιθίων	Zhang et al., 2017
Πρεβιοτικά και νεκρωτική εντερίτιδα (NE)	Ολιγοσακχαρίτες Μαννάνης (MOS) και <i>C. perfringens</i>	↑ TLR2b (MOS + NE) ↑ TLR4 (MOS + NE)	Ειλεός ορνιθίων	Yitbarek et al., 2012
Ιός	H5N1 ιός A	↑ TLR3 ↑ IFNβ	Σπλήνας, πνεύμονας, εγκέφαλος ορνιθίων	Karpala et al., 2008
Ιός	Ιός Marek (MDV)	↑ TLR3 ↑ TLR15 (MDV στο θύλακα του Fabricius). ↓ TLR3 ↓ TLR15 (MDV στο σπλήνα)	Σπλήνας, θύλακας του Fabricius, θύμος αδένας ορνιθίων	Jie et al., 2013

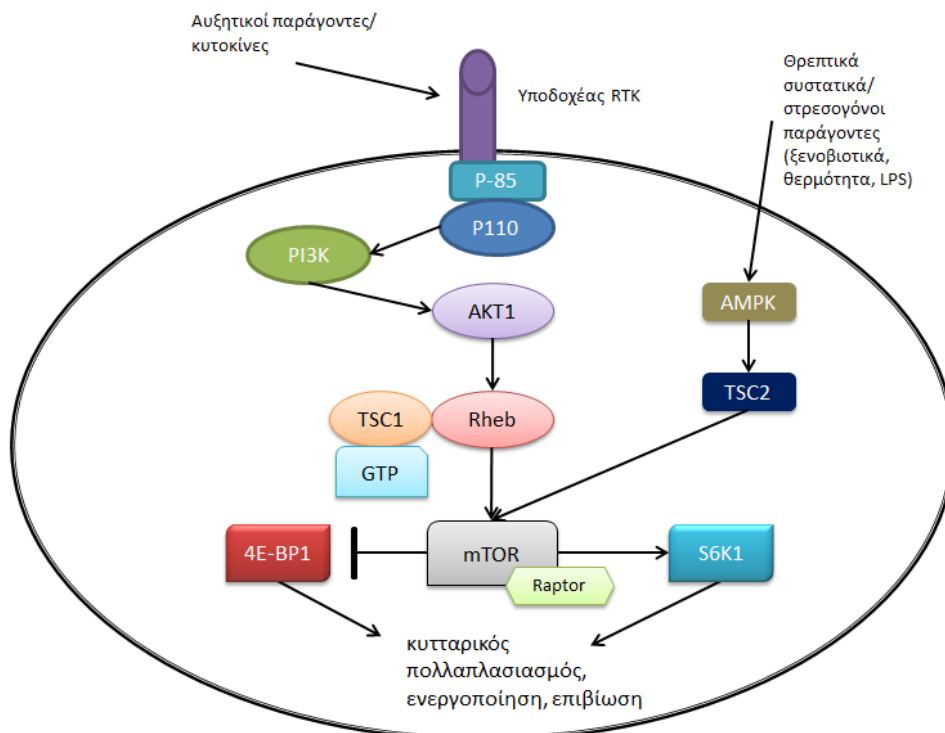
Γονότυπος και παθογόνο βακτήριο	2 σειρές ορνιθίων και <i>Salmonella enteritidis</i>	Υψηλότερη έκφραση γονιδίων στη σειρά 1 σε σχέση με τη σειρά 2.	Ετερόφιλα από το περιφερικό αίμα των ορνιθίων	Kogut et al., 2012
Γονότυπος και παθογόνο βακτήριο	Θιβετιανά ορνίθια και DaHeng S03 και <i>Salmonella enteritidis</i>	↑ TLR4 ↑ MyD88 ↑ NF-κB (SE)	Αίμα	Li et al., 2017
Καταπόνηση και παθογόνο βακτήριο	Θερμική καταπόνηση και <i>Salmonella Enteritidis</i>	↓ TLR2	Σπλήνας και δευτεροειδείς λεμφαδένες των τυφλών εντέρων	Quinteiro-Filho et al., 2017

1.2.5. Κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμός (PI3K-Akt-mTOR μονοπάτι)

Είναι γενικά γνωστό ότι τα ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 έχουν γρήγορη και πρόωμη ανάπτυξη και επιλέγονται κυρίως για τη μεγαλύτερη ανάπτυξή τους και τις αυξημένες αποδόσεις κρέατος (Vieira et al., 2012). Το *PI3KCA/Akt/mTOR* είναι ένα μονοπάτι που σχετίζεται με μυϊκή υπερτροφία, η οποία προκαλείται από την ενεργοποίηση του *Akt in vivo* (Bottje et al., 2014) και ως εκ τούτου η αξιολόγηση των σχετικών γονιδίων θα μπορούσε να είναι κρίσιμη για την παραγωγή ορνιθίων. Το μονοπάτι *PI3KCA/Akt/mTOR* αποτελείται από δύο συμπλέγματα πολλαπλών πρωτεϊνών, τα mTORC1 και mTORC2, τα οποία απαρτίζονται από μεμονωμένα μόρια δέσμευσης πρωτεΐνης για να προσαρμόσουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό. Αυτά τα σύμπλοκα είναι ευαίσθητα σε συγκεκριμένα ερεθίσματα με το mTORC1 να είναι υπερευαίσθητο σε θρεπτικά συστατικά, ενώ το mTORC2 προσαρμόζεται μέσω του PI3K και σχετίζεται με την προσθήκη κάποιου αυξητικού παράγοντα (Jhanwar-Uniyal et al., 2019). Το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων (Yang et al., 2019). Ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 4E-δεσμευτική πρωτεΐνη 1 (4EBP1) εμπλέκεται στον έλεγχο της μετάφρασης πρωτεΐνης και ενεργοποιείται από τον mTOR (Lee and Aggrey, 2016) και την πρωτεΐνη TSC2 που λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης mTOR (Huynh et al., 2015). Επιπλέον, το Akt διεγείρει έμμεσα τη δραστηριότητα του mTORC1 αναστέλλοντας το TSC2 (Bottje et al., 2014).

Όλα αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμό και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απόδοση των ορνιθίων και την πρόσληψη τροφής (Lee and Aggrey, 2016). Επίσης, είναι γνωστό ότι το AMPK διεγείρει το TSC2 το οποίο αναστέλλεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω από το Akt και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του μονοπατιού του mTOR (Hay and Sonenberg, 2004); Huynh et al., 2015). Το AMPK είναι ένας αισθητήρας θρεπτικών συστατικών, ο οποίος ενεργοποιείται ως απόκριση σε χαμηλά επίπεδα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Επιπλέον, το AMPK είναι γνωστό ότι προκαλεί την πρόσληψη γλυκόζης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων, ενεργοποιώντας μονοπάτια που παράγουν ATP μέσω των μονοπατιών μεταβολισμού γλυκόζης και λιπιδίων (Lyons and Roche, 2018; Flees et al., 2020). Ως αποτέλεσμα, η AMPK ρυθμίζει την πρόσληψη

τροφής και σχετίζεται με τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού τόσο σε κυτταρικό όσο και σε επίπεδο ολόκληρου του σώματος (Σχήμα 7, Flees et al., 2020).

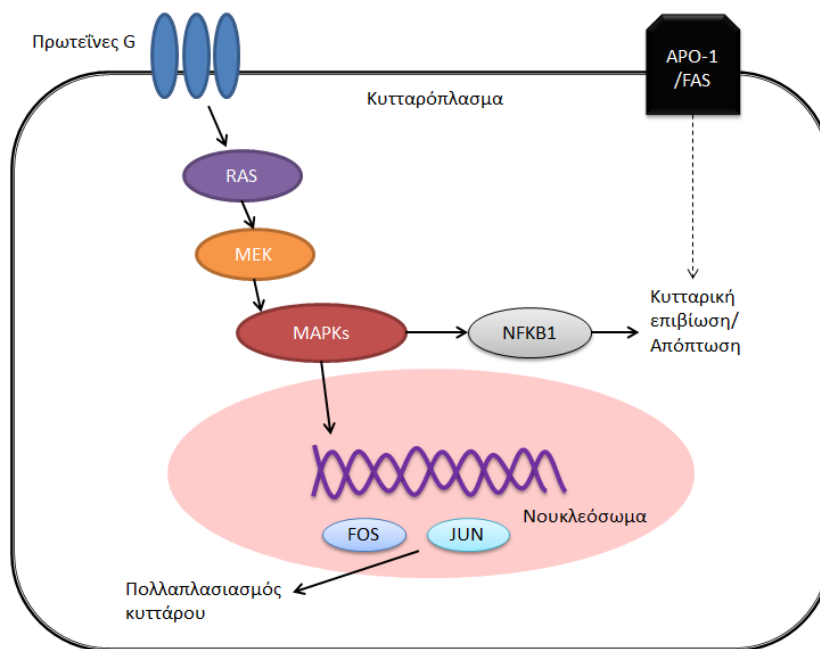


Σχήμα 7. Μοριακό μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR. Κατά τη δέσμευση του υποδοχέα από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, η φωσφοϊνοσιτιδική 3-κινάση (PI3K) ενεργοποιείται και με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την κινάση σερίνης/θρεονίνης (AKT). Το AKT μπορεί να φωσφορυλιώσει και να αδρανοποιήσει το σύμπλεγμα πρωτεϊνών οζώδους σκλήρυνσης (TSC) που δρα ως πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPase για το ομόλογο RAS. Η διατήρηση της δεσμευμένης μορφής Rheb-GTP ενεργοποιεί τον mTOR. Το mTORC1 ρυθμίζει την πρωτεΐνη που δεσμεύει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης 4E (4E-BP1), οδηγώντας στην έναρξη της μετάφρασης. Επίσης το mTORC1 φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 (S6K1) που εμπλέκεται επίσης στη μεταφραστική ρύθμιση από τη ριβοσωμική υπομονάδα 40S, ρυθμίζοντας έτσι αρκετές κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η ενεργοποίηση και η επιβίωση των κυττάρων. Το AMPK διεγείρεται είτε από θρεπτικά συστατικά είτε από παράγοντες καταπόνησης και λειτουργεί ως ρυθμιστής της σηματοδότησης του μονοπατιού του mTOR.

1.2.6. Κυτταρική απόπτωση (MAPK μονοπάτι)

Η απόπτωση (γνωστή και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο που παίζει καθοριστικό ρόλο σε βιολογικές διεργασίες όπως η εξάλειψη των κατεστραμμένων κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η ομοιόσταση των ιστών και η γήρανση. Αυτό το φαινόμενο ρυθμίζεται από μια ποικιλία μονοπατιών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης μέσω γονιδιακής έκφρασης ή/και πρωτεϊνικής δραστηριότητας (Mason and Rathmell, 2011). Μεταξύ αυτών, οι ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης που είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες πολλών οδών σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένης της αποπτωτικής οδού (**σχήμα 8**). Οι πρωτεΐνες G (πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης) είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εξωκυτταρική μετάδοση χημικών σημάτων για τη διέγερση μονοπατιών όπως αυτό του MAPK (Agalakova and Gusev, 2012). Επιπλέον, η απόπτωση συσχετίζεται με πολλά άλλα γονίδια όπως ο υποδοχέας APO1, που προκαλεί τη διέγερση των κασπασών 8 ή 10 που μπορούν να προσκολληθούν στο προ-αποπτωτικό γονίδιο BH3 (αγωνιστής θανάτου αλληλοεπιδρώντος τομέα) και ως αποτέλεσμα ασκούν αντι-αποπτωτική δράση (Özören and El-Deiry, 2003).

Άλλα γονίδια με προ-αποπτωτική ικανότητα είναι το HRAS που είναι ο κύριος μεσολαβητής του επαγόμενου από το ERK πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης (Rosseland et al., 2008). Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 (διμερές Fos/Jun) χαρακτηρίζεται μερικές φορές ως πυρηνικός παράγοντας για τη λήψη των αποφάσεων που ρυθμίζει την τύχη των κυττάρων. Ανοδικές ρυθμίσεις στα επίπεδα των πρωτεϊνών Jun και Fos και της δραστηριότητας JNK έχουν αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις στις οποίες τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση (Ameyar et al., 2003).



Σχήμα 8. Μοριακό μονοπάτι MAPK. Οι G πρωτεΐνες δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης και διεγείρουν τα MAPKs με σκοπό την παραγωγή του διμερούς Fos/Jun το οποίο ρυθμίζει την τύχη των κυττάρων. Παράλληλα παράγεται και ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB1 για να προλάβει την κυτταρική απόπτωση μέσω της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.

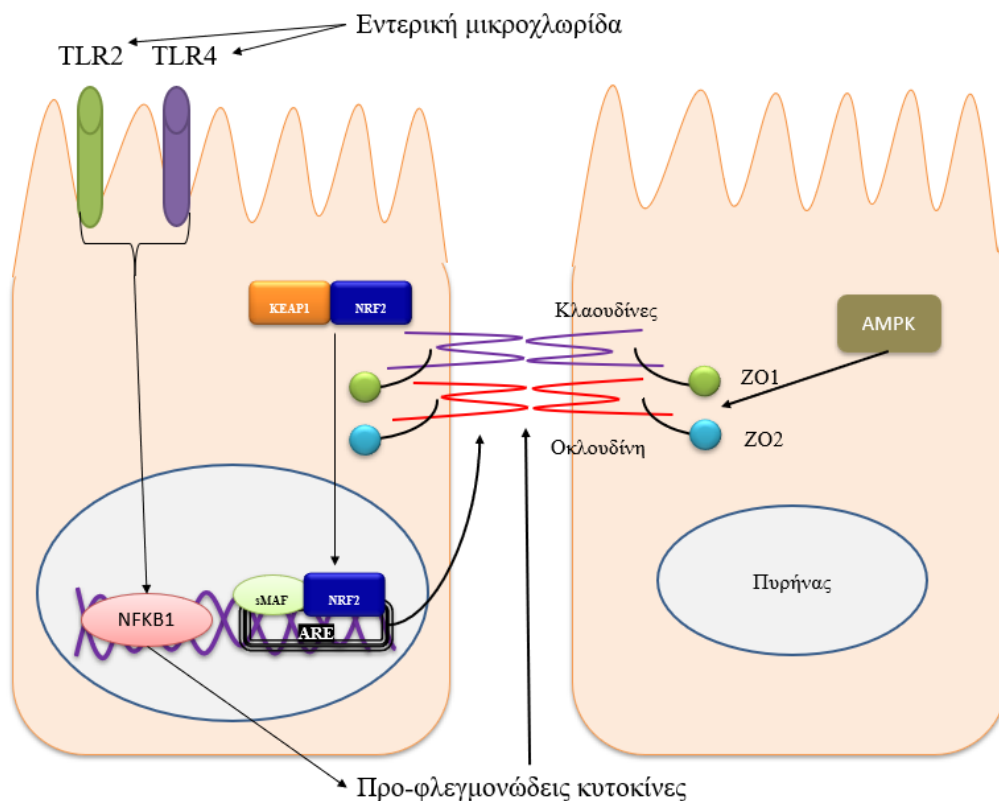
1.2.7. Αλληλεπίδραση μοριακών μονοπατιών

Αλληλεπίδραση του εντερικού φραγμού με τα υπόλοιπα μονοπάτια

Τα εντερικά TJs ρυθμίζουν τη διαπερατότητα του επιθηλίου μέσω της τρισδιάστατης και πολυπρωτεϊνικής φύσης τους. Υπάρχουν λεπτομερώς οι διαφορετικές επιδράσεις αυτών των συστατικών στην εντερική διαπερατότητα. Υπό την προϋπόθεση ότι τα εντεροκύτταρα εκφράζουν συγκεκριμένα TLRs, οι ερευνητές έχουν υποθέσει ότι οι μικροβιακοί προσδέτες ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες TJ μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τους με τα TLRs. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του MyD88, της πρωτεΐνης προσαρμογέα για τα περισσότερα TLRs, απαιτείται για την κατάλληλη έκφραση της κλαουδίνης-3 σε νεογνά ποντίκια (Rose et al., 2021). Παρόλα αυτά, η ενεργοποίηση των TLRs δεν οδηγεί πάντα σε αυξημένη λειτουργία εντερικού φραγμού και αυτό γιατί υπάρχουν και άλλα μονοπάτια που επηρεάζουν τα TJs.

Το διαπιστώθηκε ότι η οδός σηματοδότησης Nrf2/Keap1 μεσολάβησε στην ενίσχυση των TJs και στην αντιοξειδωτική ικανότητα με την προσθήκη πολυφαινολών μήλου στο σιτηρέσιο χοίρων (Huang et al., 2022). Παράλληλα, το AMPK (μονοπάτι mTOR) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συναρμολόγησης TJs και των φλεγμονωδών αποκρίσεων στα εντεροκύτταρα. Ένας γνωστός ενεργοποιητής του AMPK, η μετοφορμίνη, αναστέλλει τη σηματοδότηση NF-κB και διεγείρει την ενεργοποίηση των TJs στο εντεροκύτταρο μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από την AMPK (Wongkrasant et al., 2020).

Για τον λόγο αυτό παρακάτω παρουσιάζεται ένα απλοποιημένο σχήμα με τους βιοδείκτες που επηρεάζουν τον εντερικό φραγμό (**σχήμα 9**).



Σχήμα 9. Αλληλεπίδραση του εντερικού φραγμού με τα μονοπάτια TLR, Nrf2 και mTOR.

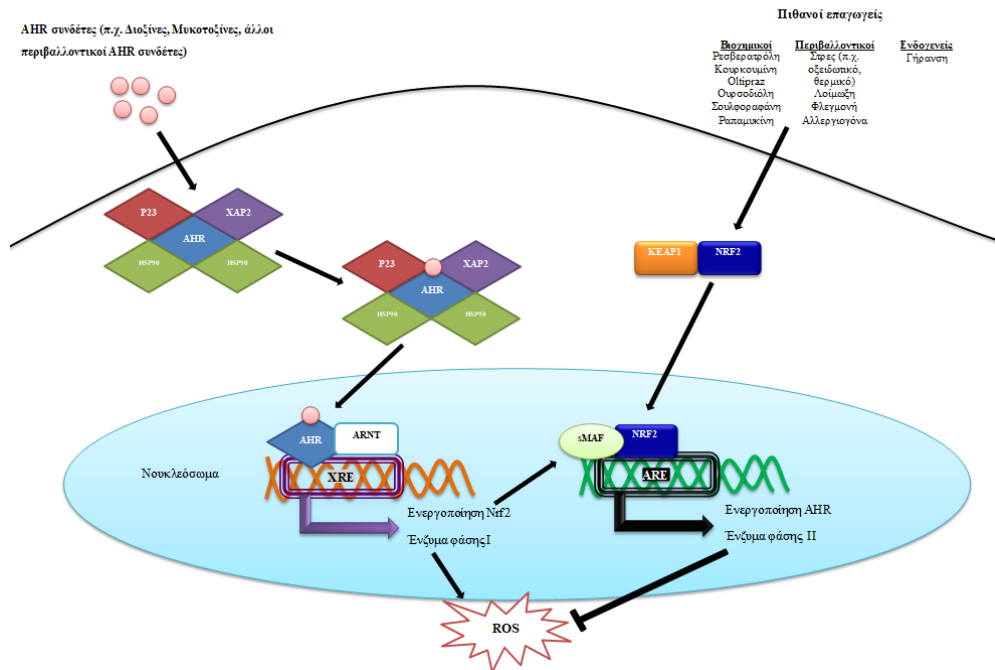
Αλληλεπίδραση των μονοπατιών σηματοδότησης AHR και Nrf2

Η συνεργιστική λειτουργία των ενζύμων φάσης I και II έναντι ξενοβιοτικών και οξειδωτικών παραγόντων που οφείλονται σε καταπονήσεις ρυθμίζεται από τις αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα υδρογονάνθρακα αρυλίου (AHR) και του παράγοντα μεταγραφής Nrf2 (Lee et al., 2018b). Συγκεκριμένα, τα ένζυμα φάσης I μεταβολίζουν ξενοβιοτικά και τα ένζυμα φάσης II αλληλεπιδρούν με μεταβολίτες της φάσης I καταλύοντας την αντίδραση σύζευξης τους και την αποτοξίνωση (Croom, 2012). Αρκετές μελέτες ανέφεραν ότι όταν τα ξενοβιοτικά εισέρχονται στον οργανισμό, ενεργοποιούν πρώτα το AHR και μετά το μονοπάτι Nrf2 (Köhle and Bock, 2006). Η έκφραση του Nrf2 ρυθμίζεται μεταξύ άλλων παραγόντων από τα AHRs (Shin et al., 2007). Τα AHRs είναι γνωστό ότι έχουν το Nrf2 ως άμεσο γονίδιο στόχο (Bortoli et al., 2018). Δύο κρίσιμα ένζυμα της φάσης II, τα οποία συνδέουν τα μονοπάτια Nrf2 και AHR είναι το NQO1 και το GST (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Γραφική αναπαράσταση ένζυμων φάσης I & II και η αλληλεπίδρασή τους (προσαρμοσμένο από Griela et al., 2021b). Τα ένζυμα φάσης I περιλαμβάνουν: κυτόχρωμα P450 1 A1 (CYP1A1), κυτόχρωμα P450 1 A2 (CYP1A2), κυτόχρωμα P450 1 B1 (CYP1B1), οξειδοαναγωγή της κινόνης 1 (NQO1) και μεταφορά της γλουταθειόνης (GST). Τα ένζυμα φάσης II περιλαμβάνουν: καταλάση (CAT), δισμουτάση του υπεροξειδίου 1 (SOD1), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR), GST, NQO1, οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1), υπεροξειρεδοξίνη 1 (PRDX1), 5-διφωσφο-ουριδίνη (UDP) -γλυκουρονοσυλομεταφοράση και θειορεδοξίνη (TXN). Τα NQO1 και GST διαθέτουν στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE) και στοιχείο ξενοβιοτικής απόκρισης (XRE) στις ρυθμιστικές τους περιοχές και για το λόγο αυτό μπορούν να ενεργοποιηθούν και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες, δηλαδή τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 που προέρχεται από ερυθροειδή και τον υποδοχέα υδρογονάνθρακα του αρυλίου (AHR).

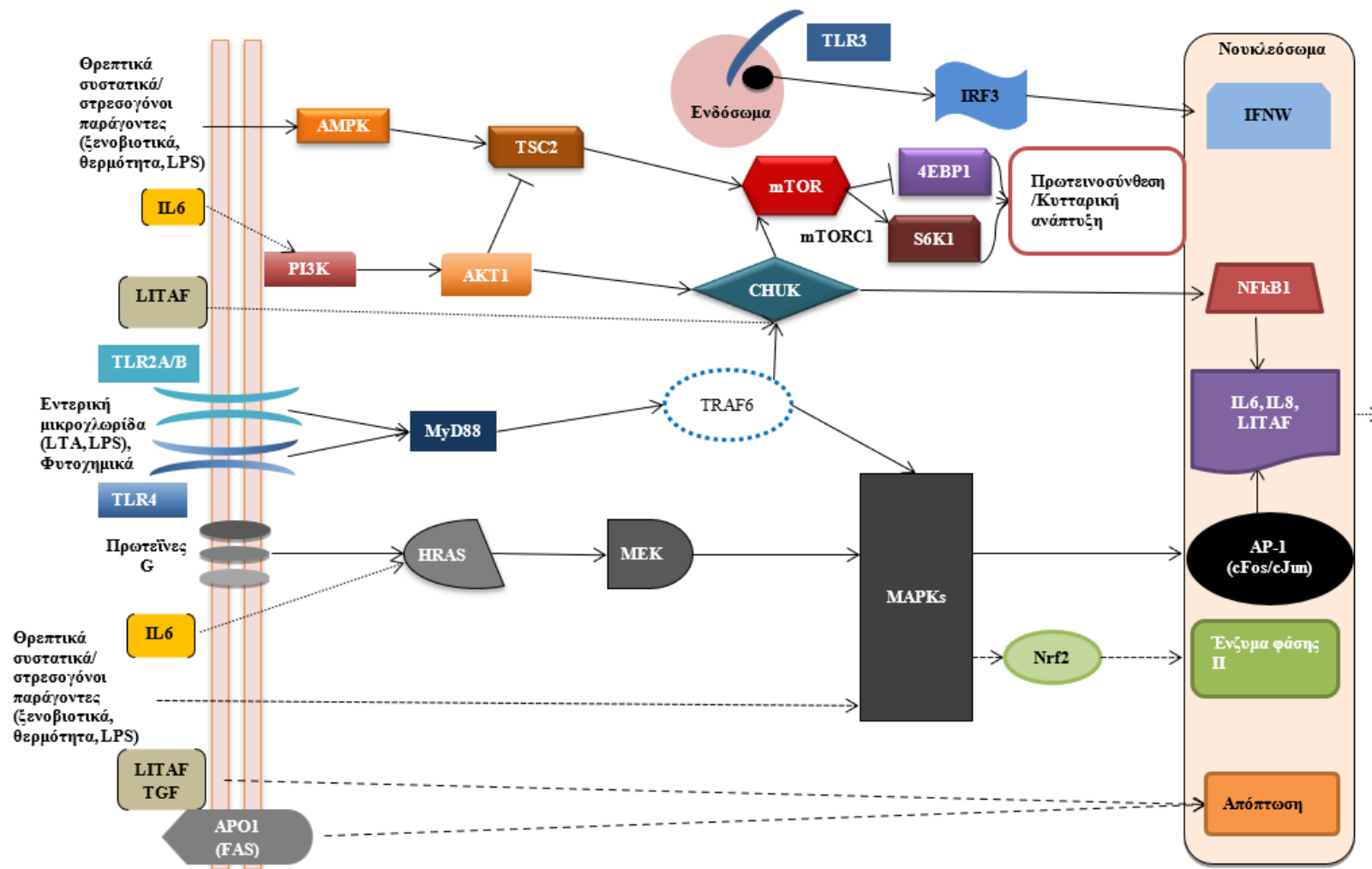
Τα NQO1 και GST έχουν επίσης ARE και XRE στις ρυθμιστικές τους περιοχές (Köhle and Bock, 2006; Lee et al., 2018b). Μια άλλη περίπτωση αλληλεπίδρασης AHR και Nrf2 βασίζεται στην ενεργοποίηση AHR των CYP που οδηγούν στην απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και με τη σειρά της, η παραγωγή ROS ενεργοποιεί το Nrf2 (Marchand et al., 2004) όπως φαίνεται στο **σχήμα 11**.



Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών *AHR-NRF2* και των αλληλεπιδράσεών τους (προσαρμοσμένο από Mountzouris et al., 2022). Ο υποδοχέας υδρογονάνθρακα αρυλίου (*AHR*) σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη *p23* (*P23*), την πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας *B* που σχετίζεται με το *X* (*XAP2*), την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (*HSP90*) και συνδέεται με προσδέτες *AHR* που εισέρχονται στο κύτταρο. Αυτό το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα μεταφέρεται στον πυρήνα για να συνδεθεί με τον πυρηνικό μετατοπιστή *AHR* (*ARNT*) σε στοιχείο ξеноβιοτικής απόκρισης (*XRE*) και ρυθμίζει την έκφραση των ενζύμων μεταβολισμού φάσης *I* όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος *P450* (*CYP1A1*, *CYP1A2* και *CYP1B1*) που ενεργοποιούν την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (*ROS*). Μετά την ενεργοποίηση από τις *ROS*, ο μεταγραφικός παράγοντας *Nrf2* αποδεσμεύεται από το σύμπλεγμα *Keap1-Nrf2* και μετατοπίζεται στον πυρήνα, συνδέεται με την πρωτεΐνη *sMAF* και διεγείρει την έκφραση των γονιδίων της κυτταροπροστατευτικής φάσης *II* και των αντιοξειδωτικών γονιδίων που εξαλείφουν τις *ROS*.

Αλληλεπίδραση των μονοπατιών σηματοδότησης TLR/MAPK/PI3K-mTOR

Υπάρχουν αρκετές συσχετίσεις μεταξύ γονιδίων στα μονοπάτια σηματοδότησης TLR και MAPK. Ειδικότερα, το *TLR2* επιλέγει και ενεργοποιεί το *Myd88* και το σύμπλεγμα IKK (*IKKα/IKKβ*) και *MAPK9 (JNK)* για να διεγείρει την εξαρτώμενη από το *NFκB/AP-1* έκφραση του *Fos/Jun* και την παραγωγή *IL6*, *IL8* και *LITAF* που όλα συμβάλλουν στον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, ο *TLR3* ενεργοποιεί μέσω του *TRIF* την εξαρτώμενη από το *IRF3* έκκριση της *IFNβ* που αναστέλλει την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο μέσω της σταθεροποίησης της p27. Επιπλέον, το *TLR4* μπορεί να χρησιμοποιήσει το *Fos/Jun (AP-1)* και την έκκριση των *LITAF* και *IFNβ* για την ενίσχυση του κυτταρικού θανάτου (Salaun et al., 2007). Τέλος, οι G-πρωτεΐνες ενεργοποιούν το *HRAS* και μέσω του μονοπατιού MAPK επάγουν το διμερές *Fos/Jun* για να εκφράσει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Agalakova and Gusev, 2012). Το μονοπάτι PI3KCA/Akt/mTOR απαρτίζεται από δύο σύμπλοκα πολλαπλών πρωτεϊνών, τα mTORC1 και mTORC2, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό. Το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων (Yang et al., 2019). Η απλοποιημένη παρουσίαση των κύριων σημείων που περιλαμβάνουν βασικά κυτταρικά μονοπάτια για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού και τη σύνθεση πρωτεϊνών καθώς και την αντιοξειδωτική απόκριση (μονοπάτι Nrf2) περιγράφεται στο **Σχήμα 12**.



Σχήμα 12. Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών TLR/MAPK/PI3K-mTOR και των αλληλεπιδράσεών τους .

2. Κεφάλαιο 2-ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΟΡΝΙΘΙΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Η διατροφή είναι ο κύριος παράγοντας που ρυθμίζει τη σύνθεση και τη μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα και κατ' επέκταση τις παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Abdelli et al., 2021). Ορισμένοι κύριοι παράγοντες της διατροφής που επηρεάζουν την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία είναι ο τύπος του σιτηρεσίου, η προσθήκη διάφορων βιοενεργών συστατικών καθώς και η παρουσία ξеноβιοτικών όπως οι μυκοτοξίνες.

2.1. Τύπος σιτηρεσίου- Επίπεδα ενέργειας και πρωτεΐνης

Η διατήρηση της καλής υγείας αλλά και των επιθυμητών παραγωγικών χαρακτηριστικών με την ταυτόχρονη ελάττωση του κόστους της διατροφής αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους στην παραγωγή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Όσον αφορά το βασικό τύπο σιτηρεσίου στο μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων αλλά και στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται κυρίως δημητριακοί καρποί όπως, ο αραβόσιτος και το σιτάρι (Beski et al., 2015). Η σύσταση του βασικού σιτηρεσίου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής καθορίζεται κυρίως από τον τύπο δημητριακού καρπού που χρησιμοποιείται αλλά και από τα επίπεδα της μεταβολιστέας ενέργειας (ME) και της ολικής πρωτεΐνης (ΟΠ). Αυτό έχει ως συνέπεια, τα τελευταία χρόνια να έχουν διερευνηθεί οι επιπτώσεις της μειωμένης πρόσληψης ενέργειας και πρωτεΐνης στις παραγωγικές αποδόσεις, την πεπτικότητα, την αντιφλεγμονώδη απόκριση και την αντιοξειδωτική κατάσταση των ορνιθίων (Yang et al., 2015; Paraskeuas et al., 2016; Taleb et al., 2017). Η διατήρηση της καλής υγείας αλλά και των επιθυμητών παραγωγικών χαρακτηριστικών με την ταυτόχρονη ελάττωση του κόστους της διατροφής αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους στην παραγωγή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατηρούνται διάφορες μελέτες που αφορούν τις επιδράσεις στη μείωση ενέργειας και/ή πρωτεΐνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων.

Πίνακας 2.1. Επιδράσεις της μείωσης ενέργειας και/ή πρωτεΐνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων.

Διατροφή	Κ.Τ.	Ρ.Α.Σ.Β.	Σ.Ε.Τ.	Βιβλιογραφία
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΟΠ και προσθήκη αμινοξέων	-	-	↑ (+ Βαλίνης και ισολευκίνης)	Berres et al., 2010
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΜΕ (3,000 vs. 2,950 kcal of ME/kg)	-	↓	↓	Bravo et al., 2011
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΜΕ και ΟΠ	-	↓	↑	Freitas et al., 2011
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΟΠ (200 vs. 170 g ΟΠ/kg)	↓	↓	↑	Houshmand et al., 2012
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΟΠ (20.5% vs. 18.5%)	-	↓	-	Laudadio et al., 2012
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΜΕ (3,200 vs. 3,000 kcal of ME/kg)	-	↓	↑	Hussein et al., 2019
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΜΕ (3,200 vs. 2,900 kcal of ME/kg)	↑	-	↑	Hu et al., 2021
Σιτηρέσιο με μειωμένη ΜΕ με σταθερό Lys:AME	↑	↓	↑	Mansilla et al., 2022

Ωστόσο, η γνώση των διατροφικών επιπτώσεων της διατήρησης σταθερού λόγου ΜΕ προς ΟΠ σε σιτηρέσια ορνιθίων με μειωμένα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ στην υγεία και την ακεραιότητα του εντέρου των ορνιθίων είναι περιορισμένη (Paraskeuas et al., 2019b). Το ίδιο κενό στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει και στον αριθμό των μελετών με την αλληλεπίδραση των φυτικών βιοενεργών συστατικών (ΦΒΣ) με τα επίπεδα πρωτεΐνης και ενέργειας των σιτηρεσίων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Το πρώτο που πρέπει να

αποσαφηνιστεί είναι αν πρόσθετες ύλες όπως τα ΦΒΣ δύναται να αντισταθμίσουν τις αρνητικές συνέπειες των χαμηλών επιπέδων ενέργειας και πρωτεΐνης στην διατροφή των πτηνών και μετέπειτα τους μηχανισμούς δράσης πίσω από τις αλλαγές στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων.

Αυτό το κενό βιβλιογραφίας δημιουργεί την ανάγκη διερεύνησης πιθανών ωφέλιμων επιδράσεων που μπορεί να έχει η συμπερίληψη ΦΒΣ, στις αναμενόμενες αρνητικές συνέπειες στα παραγωγικά χαρακτηριστικά αλλά και στον οργανισμό και την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία των ορνιθίων έπειτα από χορήγηση σιτηρεσίου με χαμηλότερα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ από τις συνιστώμενες δοσολογίες με σταθερό λόγο ΜΕ:ΟΠ.

2.2. Βιοενεργά συστατικά

Τα τελευταία χρόνια στην πτηνοτροφία λόγω των ανησυχιών των καταναλωτών για τις βλαβερές συνέπειες της χρήσης τους καθώς και η απαγόρευση τους στην ΕΕ έχουν ωθήσει τους ερευνητές να βρουν εναλλακτικές λύσεις αντί των αντιβιοτικών (Mehdi et al., 2018). Τα κυριότερα βιοενεργά συστατικά που χρησιμοποιούνται σαν εναλλακτικά πρόσθετα στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής είναι τα προβιοτικά (Jha et al., 2020; Abd El-Hack et al., 2020; Ogbuewu et al., 2022), τα ένζυμα (Giacobbo et al., 2021; Kouzounis et al., 2022), οι οξινιστές (Pearlin et al., 2020; Emili Vinolya et al., 2021; Gao et al., 2021), τα φυτικά βιοενεργά συστατικά (ΦΒΣ) (Aljumaah et al., 2020; Kikusato, 2021; Krauze, 2021) και άλλα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα τελευταία λόγω ανάγκης εύρεσης φυσικών εναλλακτικών της χρήσης των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων (Mehdi et al., 2018) και θα αποτελέσουν μέρος της ενασχόλησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Τα ΦΒΣ, που αναφέρονται επίσης ως φυτοχημικά ή φυτογενή, είναι ένα ευρύ υποσύνολο βιοδραστικών ενώσεων που προέρχονται από φυτά. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά ολικής αλέσεως, όσπρια, ξηρούς καρπούς, βότανα και αιθέρια έλαια. Τα ΦΒΣ μπορούν να χωριστούν στις ακόλουθες έξι κατηγορίες: φαινολικές ενώσεις, αλκαλοειδή, ενώσεις που περιέχουν άζωτο, οργανικές ενώσεις θείου, φυτοστερόλες και καροτενοειδή. Έχουν γίνει αρκετές έρευνες για τις φαινολικές ενώσεις και τα καροτενοειδή για να προσδιοριστούν οι βιολογικές επιδράσεις και τα χαρακτηριστικά τους (Kikusato et al., 2021).

Τα ΦΒΣ είναι επίσης γνωστά ως βότανα ή αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται σε παραδοσιακές θεραπείες. Μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη ΦΒΣ στην ευρωπαϊκή υγειονομική περίθαλψη των ζώων παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.2** (Franz et al., 2010). Μπορούν να προστεθούν στη διατροφή των παραγωγικών ζώων για τη βελτίωση των αποδόσεών τους μέσω της ενίσχυσης των ιδιοτήτων των ζωοτροφών, της προώθησης της παραγωγικής απόδοσης των ζώων και της βελτίωσης της ποιότητας των προϊόντων που προέρχονται από αυτά τα ζώα (Gheisar and Kim, 2017).

Πίνακας 2.2. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βότανα και αιθέρια έλαια στη διατροφή των ζώων και την κτηνοτροφία (Franz et al., 2010).

Όνομα	Τρόπος χρήσης
Αγριανιθιά	Έγχυμα
Άρνικα	Εκχύλισμα
Λιβάνι	Ρητίνη
Κύμινο	Σπόρος, αιθέριο έλαιο
Εσπεριδοέλαιο	Αιθέριο έλαιο
Κουρκουμάς	Ρίζωμα
Μάραθος	Σπόρος
Χαμομήλι	Έγχυμα, αιθέριο έλαιο
Μέντα	Έγχυμα, αιθέριο έλαιο
Γλυκάνισος	Σπόρος, αιθέριο έλαιο
Τερεβινθέλαιο	Αιθέριο έλαιο, (έλαιο) ρητίνη
Φασκόμηλο	Έγχυμα, αιθέριο έλαιο
Γαρύφαλλο	Οφθαλμοί, αιθέριο έλαιο
Τζίντζερ	Ρίζωμα

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ΦΒΣ προωθούν την ανάπτυξη, την αντιμικροβιακή δράση, την αντιοξειδωτική δράση και την αντιφλεγμονώδη δράση. Με βάση τη βιβλιογραφία, ο πιο πιθανός τρόπος δράσης των ΦΒΣ είναι η ρύθμιση του περιβάλλοντος του εντέρου και της εντερικής μορφολογίας στα ορνίθια.

2.2.1. Παραγωγικά χαρακτηριστικά και ΦΒΣ

Τα ΦΒΣ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αυξητικοί παράγοντες στη βιομηχανία ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Πολλές μελέτες έχουν δείξει θετικές επιδράσεις των διαιτητικών αιθέριων ελαίων στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων (Bampidis et al., 2005; Cross et al., 2007).

Οι Mountzouris et al (2011), πραγματοποίησαν πείραμα με 525 ορνίθια κρεοπαραγωγής ηλικίας 1 ημέρας συνολικής διάρκειας 6 εβδομάδων στο οποίο εξετάστηκε η επίδραση ενός ΦΒΣ ως πρόσθετο ζωοτροφής που περιλαμβάνει ένα μίγμα αιθέριων ελαίων από ρίγανη, γλυκάνισο και εσπεριδοειδή στο ρυθμό ανάπτυξης, στην κατανάλωση της τροφής και στο συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής. Το πείραμα είχε 5 επεμβάσεις, η 1^η ήταν η επέμβαση του μάρτυρα Βασικό Σιτηρέσιο (ΒΣ)-χωρίς πρόσθετο (Μ), η 2^η ΒΣ-με 80mg πρόσθετου/Kg τροφής (Ε1), η 3^η ΒΣ-με 125mg πρόσθετου/Kg τροφής (Ε2), η 4^η ΒΣ-με 250mg πρόσθετου/kg τροφής (Ε3) και η 5^η ΒΣ-με αβιλαμυκίνη 2.5mg/Kg τροφής (Α). Η επέμβαση με την αβιλαμυκίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, λόγω της αντιμικροβιακής της δράσης ως αυξητικός παράγοντας. Το σιτηρέσιο ήταν βασισμένο στο καλαμπόκι και στο σογιάλευρο με την τροφή και το νερό να παρέχονται κατά βούληση. Διαπιστώθηκε ότι σε σχέση με την επέμβαση (Μ), ο ρυθμός ανάπτυξης των ορνιθίων, αυξήθηκε με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης του ΦΒΣ. Η πρόσληψη της τροφής, μειώθηκε με την αύξηση των επιπέδων του ΦΒΣ, ενώ για την επέμβαση (Α) δε διέφερε σημαντικά σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής βελτιώθηκε, αυξάνοντας τα επίπεδα του ΦΒΣ, για την επέμβαση (Α) ο δείκτης δεν διέφερε από αυτόν των επεμβάσεων (Ε2) και (Ε3), αλλά διέφερε σημαντικά από τον δείκτη των επεμβάσεων (Ε1) και (Μ) (Mountzouris et al., 2011).

Μια ανασκόπηση δημοσιεύσεων σχετικά με την επίδραση των αιθέριων ελαίων στις παραγωγικές παραμέτρους απόδοσης έχει αναφερθεί από τους Windisch et al., (2008). Η πλειονότητα των πειραματικών αποτελεσμάτων δείχνει μειωμένη πρόσληψη τροφής σε μεγάλο βαθμό, αμετάβλητο τελικό σωματικό βάρος και επομένως βελτιωμένο δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής κατά την προσθήκη αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο (Brenes and Roura, 2010).

Οι Marcincakova και οι συνεργάτες της ανέφεραν, ότι η συμπλήρωση με αιθέρια έλαια στη διατροφή, δεν είχε ευεργετική επίδραση στο σωματικό βάρος και στην πρόσληψη τροφής (Marcinčáková et al., 2016). Οι Cross et al., (2007) ανέφεραν, ότι το θυμάρι είχε διαφορετική επίδραση, όταν χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετο για αύξηση βάρους και σωματική μάζα. Τα αιθέρια έλαια ή τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου δεν επηρέασαν την αύξηση του σωματικού βάρους ή την αποτελεσματικότητα της τροφής στα ορνίθια κρεοπαραγωγής (Bampidis et al., 2005; Cross et al., 2007). Παρόμοια παρατήρηση έγινε επίσης από τους Hernandez et al. (2004), οι οποίοι διαπίστωσαν, ότι

η προσθήκη δύο φυτικών εκχυλισμάτων στη διατροφή δεν είχε καμία επίδραση στο σωματικό βάρος (Hernández et al., 2004). Επιπροσθέτως οι Hernandez *et al.* (2004) και οι Botsologlu *et al.* (2004) διαπίστωσαν, ότι η προσθήκη φυτικών εκχυλισμάτων στη διατροφή δεν είχε ευεργετική επίδραση στο δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής (Botsoglou et al., 2004; Hernández et al., 2004).

Οι Gopi *et al.* (2012) ανέφεραν, ότι υπήρξε βελτίωση της αύξησης του σωματικού βάρους σε ορνίθια, που τρέφονταν με σκόνη κανέλας. Στην πρώτη επέμβαση το πρόσθετο βρισκόταν σε συγκέντρωση 500 ppm ενώ στη δεύτερη σε 250 ppm. Ως αποτέλεσμα τα σωματικά βάρη για την πρώτη και την δεύτερη επέμβαση ήταν, 2109g και 1982g αντίστοιχα, έναντι της επέμβασης του μάρτυρα που ήταν 1947 g. Η μετατρεψιμότητα της τροφής ήταν σημαντικά καλύτερη στις επεμβάσεις, με την προσθήκη συγκριτικά με την επέμβαση του μάρτυρα (1,79 και 1,83 έναντι 2,03; Gopi et al., 2014).

Σε πείραμα τους οι Basmacioglu *et al.* (2016) διερεύνησαν την επίδραση ενός μείγματος οργανικού οξέος και αιθέριου ελαίου, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, στην φαινομένη πεπτικότητα σε ορνίθια κρεοπαραγωγής. Διαπιστώθηκε, ότι η προσθήκη στο σιτηρέσιο μίγματος αιθέριου ελαίου μεμονωμένα ή και σε συνδυασμό με μίγμα οργανικού οξέος, έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των ορνιθίων, και βελτίωση της μετατρεψιμότητας της τροφής σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα. Οι επεμβάσεις προσθήκης, δεν είχαν σημαντική επίδραση στην κατανάλωση τροφής (Basmacioglu-Malayoğlu et al., 2016).

Η μειωμένη πρόσληψη της τροφής μπορεί, να αποδοθεί σε έντονα αρώματα ή γεύσεις, που πιθανόν να χαρακτηρίζουν την τροφή, ιδιαίτερα και όταν η προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε αυτή πραγματοποιείται με μεγάλες δόσεις. Σε αντίθεση με την πρόσληψη τροφής, για τις θετικές επιδράσεις στην αύξηση του σωματικού βάρους και στην μετατρεψιμότητα της τροφής, κυριαρχούν στις αναφορές δύο ευρέως αποδεκτοί μηχανισμοί: α) η διέγερση της έκκρισης πεπτικών ενζύμων και β) η σταθεροποίηση της σύνθεσης της μικροχλωρίδας του εντέρου, οδηγώντας σε βελτιωμένη χρήση τροφής (Gopi et al., 2014).

Ωστόσο, οι (Botsoglou et al., 2004) αναφέρουν, ότι τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβεβαιώνονται από την αυξημένη πεπτικότητα των θρεπτικών ουσιών, αλλά δεν αντανakλούν τις παραμέτρους ανάπτυξης. Έχει προταθεί, ότι η πρόωμη απορρόφηση

ή ο μεταβολισμός αυτών των πρόσθετων κατά την είσοδο στο δωδεκαδάκτυλο είναι ο λόγος. Επομένως, η προστασία των πρόσθετων από τον πρώιμο μεταβολισμό και απορρόφηση μπορεί, να είναι μια προσέγγιση για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους.

Πιο πρόσφατες μελέτες για την επίδραση των ΦΒΣ στις ζωοτεχνικές παραμέτρους 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.) παρουσιάζονται στον συγκεντρωτικό **Πίνακα 2.3** όπου αναφέρεται το είδος του ΦΒΣ, οι επιδράσεις στα παραγωγικά χαρακτηριστικά καθώς και η βιβλιογραφία.

Πίνακας 2.3. *Επίδραση των ΦΒΣ στις ζωοτεχνικές παραμέτρους. Παρουσιάζονται το είδος του ΦΒΣ, οι επιδράσεις στα παραγωγικά χαρακτηριστικά καθώς και η βιβλιογραφία.*

ΦΒΣ	Κ.Τ.	Ρ.Α.Σ.Β.	Σ.Ε.Τ.	Βιβλιογραφία
Φυτικό εκχύλισμα από <i>Compositae, Labiateae, Apiaceae, Rutaceae</i> και <i>Fabaceae</i> + αιθέρια έλαια λιμονένιο, ανηθόλη, καρβακρόλη και θυμόλη (1 g /kg σιτηρεσίου)	-	-	-	Erdoğan et al., 2010
ΦΒΣ (θυμόλη και καρβακρόλη), 0, 60, 120, 240 mg/kg σιτηρεσίου	-	-	↓	Du et al., 2016
ΦΒΣ με συστατικά μενθόλη/ανηθόλη (150mg/kg) + ΦΒΣ με συστατικά καρβακρόλη/θυμόλη/λιμονένιο	-	↑ (ΜΑ 150)	↓ (ΜΑ 150) (ΚΘΛ 100)	Hafeez et al., 2016
Μίγμα αιθέριων ελαίων (ΜΑΕ) ρίγανης, γλυκάνισου, φλοιού εσπεριδοειδών,	-	-	↓	Paraskeuas et al., 2016

125 mg/kg τροφής,				
ΜΑΕ με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη	-	↑	↓	Paraskeuas et al., 2017a
ΜΑΕ με συστατικά μενθόλη, ανήθολη και ευγενόλη	↓	↑	↓	Paraskeuas et al., 2017b
Σορβικό οξύ, φουμαρικό οξύ και θυμόλη (0.30 g/kg σιτηρεσίου)	-	-	↓	Yang et al., 2018
ΜΑΕ με συστατικά θυμόλη και καρβακρόλη(60 και 120 mg/kg σιτηρεσίου)	-	↑	-	Lee et al., 2020
Φυτοβιοτικές φυσικές ενώσεις (Sangrovit Extra) 0.12 g/kg σιτηρεσίου	-	↑	↓	Hussein et al., 2020
Πούδρα αποξηραμένων φύλλων <i>Persicaria odorata</i> (8 g/kg σιτηρεσίου) και <i>Piper betle</i> (4 g/kg σιτηρεσίου)	-	↑	↓	Basit et al., 2020
Φουμαρικό, σορβικό, μηλικό και κιτρικό οξύ + θυμόλη, βανιλίνη και ευγενόλη	-	↑	↓	Stefanello et al., 2020
Οργανικά οξέα (κιτρικό και σορβικό οξύ) και συνθετικά αιθέρια έλαια (θυμόλη και βανιλίνη)	-	-	-	Stamilla et al., 2020
ΦΒΣ (Entex, 0.5 kg/t σιτηρεσίου)	-	↑	↓	Tavangar et al., 2020
ΦΒΣ έλαιο κανέλας (3000 mg/L) και κιτρικού οξέος (150 mg/L)	-	↑ (0.1, και 0.25)	↓ (0.1, και 0.25)	Krauze et al., 2021
Δοσολογία 0.05, 0.1, και 0.25 mL/L νερού				

Μικροκάψουλες με αιθέρια έλαια από θυμάρι, θρούμπη, μέντα και μαύρο πιπέρι (0.5, 1 και 2% ανά τόνο τροφής)	↓	-	↓	Moharreri et al., 2022
---	---	---	---	------------------------

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι η Κ.Τ. παραμένει ίδια στις περισσότερες μελέτες (13/15). Σε δύο μόνο μελέτες παρατηρήθηκε μείωση της Κ.Τ. (Paraskeuas et al., 2017a; Moharreri et al., 2022). Και στις δύο μελέτες χρησιμοποιήθηκε μίγμα αιθέριων ελαίων (ΜΑΕ) με κοινό βιοδραστικό συστατικό τη μενθόλη και οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση κατανάλωσης της τροφής ήταν παρεμφερείς. Παράλληλα για τον Ρ.Α.Σ.Β. παρατηρήθηκε αύξηση με την προσθήκη του ΦΒΣ για τις περισσότερες μελέτες (9/15) ανεξάρτητα από τον τύπο του ΦΒΣ και τις διαφορετικές συγκεντρώσεις προσθήκης. Στις υπόλοιπες μελέτες ο Ρ.Α.Σ.Β. δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη του ΦΒΣ. Τέλος ο Σ.Ε.Τ. επηρεάστηκε σε όλες τις μελέτες εκτός από τρεις (12/15). Στις 12 αυτές μελέτες με αιθέρια έλαια και ΦΒΣ ο Σ.Ε.Τ. βελτιώθηκε (μειώθηκε) σημαντικά σε σχέση με την επέμβαση του μάρτυρα ανεξάρτητα απ' τη δοσολογία και τον τύπο του ΦΒΣ. Η βελτίωση του Σ.Ε.Τ. δείχνει να οφείλεται κυρίως στην βελτίωση του Ρ.Α.Σ.Β.

Στη δημοσίευση του Irawan και των συνεργατών του το 2021 όπου δημιούργησαν μια μετα-ανάλυση των δημοσιεύσεων με ΦΒΣ και αιθέρια έλαια αναφέρουν ότι οι επιδράσεις των ΜΑΕ στην απόδοση είναι μεταβλητές ανάλογα με τις φυτικές πηγές που προήλθαν, οι ευεργετικές επιδράσεις είναι πανομοιότυπες μεταξύ διαφορετικών πηγών και τύπων ΜΑΕ, και αυτές εξαρτώνται από τη δόση. Επίσης τα ασαφή ευρήματα μεταξύ προηγούμενων μελετών που διέπουν τον μηχανισμό σχετικά με τον τρόπο δράσης των αιθερίων ελαίων που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής μπορεί να αποδοθούν στην αυξανόμενη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, στο ύψος της λάχνης καθώς και σε τροποποίηση των μοριακών μονοπατιών ανάλογα με τη δόση των αιθερίων ελαίων και των κύριων βιοδραστικών συστατικών του κάθε αιθερίου ελαίου (Irawan et al., 2021).

2.2.2. Εντερικός φραγμός και ΦΒΣ

Όλο και περισσότερα στοιχεία αποκαλύπτουν ότι τα ΦΒΣ πιθανόν να μην χρειάζεται να απορροφηθούν για να ασκήσουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα. Τα μη απορροφούμενα ΦΒΣ μπορεί να προάγουν την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία μέσω του εντερικού φραγμού που αποτελείται από διάφορα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων, της στιβάδας της βλέννης (MUC2), της ανοσοσφαιρίνης Α (IgA) και των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (TJs). Αυτή ουσιαστικά θεωρείται η πρώτη γραμμή άμυνας κατά την εισβολή παθογόνων και τοξινών στη γαστρεντερική οδό. Μόλις καταστραφεί η στιβάδα της βλέννας και οι φραγμοί της TJ στο λεπτό έντερο εμφανίζεται συστηματική και εντερική φλεγμονή, πυροδοτώντας έτσι διάφορες χρόνιες ασθένειες μέσω εισβολής παθογόνων (Kikusato, 2021).

Στον παρακάτω **πίνακα (2.4)** φαίνονται κάποιες επιδράσεις ΦΒΣ στους βιοδείκτες που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό.

Πίνακας 2.4. *Επίδραση ΦΒΣ σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το μονοπάτι του εντερικού φραγμού.*

ΦΒΣ	Ζώο	TJs	Βιβλιογραφία
<i>Ρεσβερατρόλη</i>	Κόλον από ποντίκια	↑ ZO2, OCLN, CLDNs	Mayangsari and Suzuki, 2018
<i>Ρεσβερατρόλη</i>	Νήστιδα ορνιθίων κρεοπαραγωγής	↑ OCLN, CLDN1, MUC2	Zhang et al., 2017
<i>Κερσετίνη</i>	Caco-2 κύτταρα	↑ ZO2, OCLN, CLDN1	Suzuki and Hara, 2009
<i>Ναριγκενίνη</i>	Κόλον από ποντίκια	↑ OCLN, CLDN3, JAM-A	Azuma et al., 2013
<i>Αιθέριο έλαιο ρίγανης</i>	Νήστιδα χοίρων	↑ ZO1, OCLN	Zou et al., 2016
<i>Καρβακρόλη</i>	Επιθηλιακό ξέσμα λεπτού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής	↑ ZO1, ZO2, OCLN, CLDN1, CLDN5	Liu et al., 2018b

Στον πίνακα 2.4 παρατηρούμε ότι σε όλες τις μελέτες αυξήθηκαν οι βιοδείκτες που αφορούν το μονοπάτι του εντερικού φραγμού, παρόλα αυτά η εντερική ακεραιότητα και λειτουργία εξαρτάται από ένα πλήθος μεταβολικών μονοπατιών και παραγόντων που θα αναλυθούν παρακάτω.

2.2.3. AHR μονοπάτι και ΦΒΣ

Ένας μεγάλος όγκος βιβλιογραφίας παρέχει στοιχεία ότι το AHR δεσμεύει διάφορες ενδογενώς παραγόμενες καθώς και φυτικές και μικροβιακές ενώσεις, όπως ινδόλες, εικοσανοειδή, πολυφαινόλες και φαιναζίνες και εμπλέκεται στη ρύθμιση διαφόρων φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, διατήρησης και λειτουργίας ορισμένων πληθυσμών ανοσοκυττάρων (Vogelely et al., 2019).

Δεδομένου αυτού του πολύπλοκου ρόλου του AhR στην ανθρώπινη φυσιολογία και παθοφυσιολογία, έχει μεγάλο ενδιαφέρον ο εντοπισμός ξеноβιοτικών που παρεμβαίνουν στις λειτουργίες του AhR. Πράγματι, βρέθηκαν πολλές ενώσεις, που προέρχονται από τη διατροφή, οι οποίες είναι οι προσδέτες του AhR, που προκαλούν αλληλεπιδράσεις τροφής-φαρμάκων, επιδρούν στην ανθρώπινη φυσιολογία και επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία (Bartoňková and Dvořák, 2018).

Παρακάτω αναφέρονται πειραματικά στοιχεία από αρουραίους και ανθρώπους που παρουσιάζονται στη μελέτη των Bartoňková και Dvořák το 2018. Κατασταλτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων κύμινου παρατηρήθηκαν σε κύτταρα ήπατος αρουραίου στην εξαρτώμενη από τη διοξίνη έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από το AhR. Επίσης, η πρόληψη της καρκινογένεσης και η προστασία έναντι της κυτταρικής βλάβης που προκαλείται από ξеноβιοτικά παρατηρήθηκε σε αρουραίους όταν χορηγήθηκε MAE με κύριο συστατικό το κύμινο. Η λιγουστιλίδη, κατέστειλε την AhR-εξαρτώμενη έκφραση του CYP1A1 και την επακόλουθη βλάβη στο δέρμα. Το λιμονένιο, συστατικό MAE άνηθου (40%), κύμινου (44%), δυόσμου (25%), αστεροειδή γλυκάνισου (9%) και άλλων, δοκιμάστηκε έναντι της επαγωγής του CYP1A1 και δεν παρουσίασε καμία επίδραση στο μονοπάτι AhR. Η ευγενόλη, κύριο συστατικό του ΑΕ του γαρύφαλλου, βρέθηκε ως ενεργοποιητής του AhR που επάγει την πυρηνική μετατόπιση του AhR και την έκφραση των γονιδίων-στόχων AhR. Τα χημειοπροληπτικά αποτελέσματα της ευγενόλης καταδείχθηκαν σε κύτταρα MCF-7, όταν η προκαλούμενη από AhR γονοτοξικότητα εξασθένησε παρουσία ευγενόλης. Τέλος, η διατροφική ευγενόλη μείωσε τα επίπεδα του CYP1A1 (Bartoňková and Dvořák, 2018).

Στα ορνίθια οι μοριακοί μηχανισμοί που στηρίζουν την απόκριση τους στην οξειδωτική καταπόνηση δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Στον **πίνακα 2.5** παρουσιάζεται μια σειρά μελετών που διερευνούν τις επιδράσεις των φυτοχημικών χωρίς ή σε

συνδυασμό με ξενοβιοτικά όπως οι μυκοτοξίνες, στο μονοπάτι σηματοδότησης AHR και την έκφραση των ενζύμων της φάσης I (Muhammad et al., 2017; Kim et al., 2019; Ates and Ortatatli, 2021). Έχει αποδειχθεί ότι διάφορα φυτοχημικά μείωσαν τον AHR και τα σχετικά ένζυμα της Φάσης I στο ήπαρ ορνιθίων (Kim et al., 2019; Ates and Ortatatli, 2021) στον σπλήνα και στις αμυγδαλές των τυφλών (Muhammad et al., 2017). Το έντονο ενδιαφέρον για τα φυτοχημικά περιλαμβάνει την αποσαφήνιση της πιθανής λειτουργίας τους ως προσδέτες των AHR καθώς και τις επιδράσεις τους σε γονίδια και μεταβολικές οδούς που σχετίζονται με τη λειτουργία και την υγεία του εντέρου (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018).

Πίνακας 2.5. Περιπτώσεις μελετών σηματοδότησης AHR μονοπατιού σε ορνίθια με τη διατροφική συμπερίληψη φυτοχημικών (προσαρμοσμένο από Mountzouris et al., 2022).

Φυτοχημικά	Κύτταρα	AHR μονοπάτι	Βιβλιογραφία
<i>Κουρκουμίνη</i>	Ηπατοκύτταρα	↓ CYP2A6	Muhammad et al., 2017
<i>Ινδόλη</i>	Δευτερογενείς λεμφικοί αδένες των τυφλών εντέρων, Σπλήνας	↓ AHR, CYP1A4, CYP1A5 (Δευτερογενείς λεμφικοί αδένες των τυφλών εντέρων)	Kim et al., 2019
<i>Σπόροι Nigella sativa</i>	Ηπατοκύτταρα	↓ AHR, CYP1A1, CYP2A6	Ates and Ortatatli, 2021

2.2.4. Nrf2 μονοπάτι και ΦΒΣ

Η οξειδωτική καταπόνηση εμφανίζεται όταν ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) υπερβαίνει την κυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία ρυθμίζεται από αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η αντιοξειδωτική δράση των ΦΒΣ, ιδιαίτερα των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών, καθορίζεται κυρίως από τη δομή και την μετεγκατάσταση ηλεκτρονίων σε έναν αρωματικό πυρήνα. Έχει επίσης προταθεί ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις επιδεικνύουν αντιοξειδωτικές επιδράσεις μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών, αντί του μοναδικού τρόπου δράσης των τυπικών συνθετικών αντιοξειδωτικών. Οι ευεργετικές επιδράσεις των ΦΒΣ θεωρείται ότι οφείλονται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Kikusato, 2021).

Τα ΦΒΣ θεωρούνται παραδοσιακά ως αντιοξειδωτικά και πρόσφατα, έχει προταθεί ότι αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν στην εξάλειψη των ROS, όχι μόνο με την άμεση αντιοξειδωτική δράση, αλλά και με την πρόκληση της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων. Το Nrf2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων και πρωτεϊνών για την προστασία των κυττάρων από οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τραυματισμό και φλεγμονή. Η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούν το μονοπάτι Nrf2 και επάγουν την έκφραση των SOD και CAT των ελεύθερων ριζών ROS. Στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, η οξειδωτική καταπόνηση του εντέρου που προκαλείται από το LPS μετριάστηκε από την κερσετίνη μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Nrf2. Η ενεργοποίηση του Nrf2 αναστέλλει επίσης το NF-κB και προάγει την έκφραση του μεταφορέα πεπτιδίου 1 στα εντερικά κύτταρα. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι Nrf2 παίζει ρόλο στη βελτιωτική επίδραση των ΦΒΣ (Kikusato, 2021).

Πίνακας 2.6. Περιπτώσεις μελετών σηματοδότησης Nrf2 μονοπατιού σε πτηνά που ασχολούνται με το θέμα της διατροφικής συμπερίληψης φυτοχημικών.

Φυτοχημικά	Κύτταρα	Nrf2 μονοπάτι	Βιβλιογραφία
<i>Εκχύλισμα μπρόκολου, Κουρκουμάς, ρίγανη, θυμάρι, δεντρολίβανο</i>	Νήστιδα, Κόλον, Ηπατοκύτταρα	↑ ARE genes (HO-1, TrxR1) στη νήστιδα	Mueller et al., 2012
<i>Κουρκουμίνη</i>	Ηπατοκύτταρα	↑ Nrf2, HO-1, ↓ HSP70	Sahin et al., 2012
<i>Artemisia annua</i>	Νήστιδα	↑ Nrf2, HO-1, GPx, SOD	Song et al., 2018
<i>Κουρκουμίνη</i>	Ηπατοκύτταρα	↑ Nrf2, CAT	Zhang et al., 2018
<i>Κουρκουμίνη</i>	Ηπατοκύτταρα	↑ Nrf2, GSTs	Wang et al., 2018
<i>Λυκοπένιο</i>	Ωοθήκες	↑ Nrf2, HO-1, Gclc, Gclm, Gpx1, Txnrd	Liu et al., 2018a
<i>Σπόρος σταφυλιού</i>	Σπλήνας	↑ Nrf2, HO-1, NQO1, GPx	Rajput et al., 2019
<i>Κουρκουμίνη</i>	Κύτταρα ινοβλαστών	↑ Nrf2, CAT, SOD, GSTs	Wu et al., 2019
<i>Μίγμα βασισμένο σε τζίντζερ, βάλαμο</i>	Δωδεκαδάκτυλος, Νήστιδα, Ειλεός, Τυφλά	↑ Nrf2, HO-1, NQO1, GPx Δωδεκαδάκτυλος=τυφλά >ειλεό	Mountzouris et al., 2020

<i>λεμονιού, ρίγανη, θυμάρι Κερσετίνη</i>	Νήσιτιδα	↑ Nrf2, HO-1, NQO1, SOD	Sun et al., 2020
<i>Ρεσβερατρόλη</i>	Ωοθήκες	↑ Nrf2, SOD-1, HO-1	Xing et al., 2020
<i>Σκόνη φύλλων Moringa oleifera και σκόνη φύλλων μουριάς</i>	Ήπαρ	↑ SOD	Li et al., 2022
<i>Shudi Erzi San</i>	Ωοθήκες	↑ SOD, Prdx	Zhang et al., 2022b

Οι περισσότερες από τις διαθέσιμες μελέτες έχουν εξετάσει τις επιδράσεις των φυτοχημικών στο μονοπάτι σηματοδότησης Nrf2 και την έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων του (Πίνακας 2.6). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η διατροφική προσθήκη διαφόρων φυτοχημικών προκάλεσε την έκφραση του Nrf2 και των αντιοξειδωτικών του γονιδίων Φάσης II στο ήπαρ ορνιθίων (Sahin et al., 2012; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2018), στον σπλήνα (Rajput et al., 2019), σε κύτταρα ινοβλαστών (Wu et al., 2019), στο έντερο (Mueller et al., 2012; Song et al., 2018; Sun et al., 2020; Mountzouris et al., 2020) καθώς και στις ωοθήκες (Liu et al., 2018a; Xing et al., 2020; Zhang et al., 2022b). Επιπλέον, στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, η διαμόρφωση του μονοπατιού Nrf2 βρέθηκε να είναι δόσοεξαρτώμενη και επιπλέον το μέγεθος της διαμόρφωσης έδειξε να εξαρτάται από την εντερική θέση του ορνιθίου (Mountzouris et al., 2020). Η ενίσχυση της προσαρμοστικής ικανότητας των κρεοπαραγωγών ορνιθίων να αντιστέκονται στο οξειδωτικό στρες μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης Nrf2 μπορεί να είναι το κλειδί για περαιτέρω προστασία από τις μυκοτοξίνες (Wang et al., 2018; Rajput et al., 2019). Μέχρι στιγμής, καμία μελέτη δεν έχει εξετάσει τις επιδράσεις των φυτοχημικών στα μονοπάτια σηματοδότησης AHR και Nrf2 στα ορνίθια. Ωστόσο, οι Singh et al. (2019) έχει διερευνήσει σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα ποντικών τις επιδράσεις της ουρολιθίνης A, ενός μεταβολίτη που παράγεται από μούρα, σταφύλια και καρύδια στα μονοπάτια AHR και Nrf2 και στα σχετικά γονίδια Φάσης I και Φάσης II. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο φυτοχημικό μπορεί να έχει τη δυνατότητα να ενισχύσει τη λειτουργία του φραγμού του εντέρου ρυθμίζοντας τα μονοπάτια AHR και Nrf2 και τα σχετικά γονίδια τους. Η πιθανή τροποποίηση των μονοπατιών AHR και Nrf2 από διατροφικά φυτοχημικά είναι ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος περαιτέρω προστασίας των ορνιθίων από τις επιζήμιες συνέπειες του οξειδωτικού στρες .

2.2.5. Επίδραση ΦΒΣ επί της ανοσολογικής απόκρισης, της κυτταρικής απόπτωσης και της πρωτεϊνοσύνθεσης

Όπως περιεγράφηκε παραπάνω το πρώτο μονοπάτι που αφορά την εντερική υγεία είναι το μονοπάτι ενεργοποίησης της ανοσο-απόκρισης, η οποία όπως αναφέρθηκε αρχίζει από τους υποδοχείς Toll-like στο εντερικό επιθήλιο και καταλήγει στα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπου πυροδοτούν την έμφυτη και την επίκτητη ανοσία. Παρακάτω παρουσιάζεται μια εικόνα της επίδρασης των ΦΒΣ επί του μονοπατιού των TLRs όπως παρουσιάζεται στη διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας 2.7).

Πίνακας 2.7. Επίδραση ΦΒΣ σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το TLR μονοπάτι.

ΦΒΣ	Δοσολογία	Ιστός	Βιοδείκτες	Βιβλιογραφική Αναφορά
ΜΑΕ θυμόλης και καρβακρόλης	60, 120, 240 mg/kg σιτηρεσίου	Ειλεός	↓ TLR2	Du et al., 2016
ΜΑΕ καρβακρόλης, θυμόλης και κυμένιο	200 μl/ ημέρα	Εντερικό επιθήλιο	↓ IL1β, IL6, TNFα, TLR4, NFκB1	Liu et al., 2019a
ΜΑΕ καρβακρόλης, ανηθόλης και λιμονένιου	125 mg/kg σιτηρεσίου	Επιθήλιο ειλεού και τυφλών, λεμφαδένες του τυφλού εντέρου, σπλήνας	↓ TLR2	Paraskeuas and Mountzouris, 2019b
ΜΑΕ με τζίντζερ, βάλσαμο λεμονιού, ρίγανη και θυμάρι	750, 1000, 2000 mg/kg σιτηρεσίου	Εντερικό επιθήλιο από όλα τα τμήματα του εντέρου	↓ TLR4, NFκB1	Mountzouris et al., 2020
Εκχύλισμα γλυκόριζας σε σκόνη	0.25, 0.5, 1 και 2 g/kg σιτηρεσίου	Νήστιδα	↓ TLR4, IL1-β	Tufarelli et al., 2020
Taraxacum και Astragalus membranaceus Bunge	9 g/kg βάρους ορνιθίων	Τυφλά έντερα	↓ TLR4	Liang et al., 2021
Βιολογικός πυρήνας cranberry	1%, 2% του σιτηρεσίου	Ήπαρ και θύλακας του Fabricius	↓ IL4, IFN-γ, MyD88, TLR3 ↑ IL10	Das et al., 2021
ΜΑΕ καρβακρόλης,	125 ppm	Νήστιδα και ειλεός	↓ IL6	Wang et al., 2021

ανηθόλης και λιμονένιου				
ΜΑΕ καρβακρόλης, θυμόλης και οργανικών οξέων	200, 500 και 800 mg/kg	Επιθήλιο νήστιδας	↓ TLR2, TLR4, IFN γ , NF κ B1	Pham et al., 2022
Μαύρο πιπέρι (Piper nigrum) σε σκόνη	0.25, 0.5, 0.75 και 1% του σιτηρεσίου	Αίμα	↓ TLR2, ↑ TLR4	Chalana et al., 2022

Όπως παρουσιάζεται στη μελέτη των Du και των συνεργατών του το 2016, με την προσθήκη ΜΑΕ θυμόλης και καρβακρόλης, διαπιστώθηκε μείωση της γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα *TLR2* στο επιθήλιο του ειλεού (Du et al., 2016). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στην μελέτη των Paraskeuas και Mountzouris το 2019 με την προσθήκη ΜΑΕ καρβακρόλης, ανηθόλης και λιμονένιου στο επιθήλιο ειλεού και των τυφλών εντέρων σε ορνίθια κρεοπαραγωγής (Paraskeuas and Mountzouris, 2019b). Επιπρόσθετα, σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής με 200 μl χορήγησης ΜΑΕ καρβακρόλης, θυμόλης και κυμένιου ανά ημέρα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των κυτοκινών *IL1 β* , *IL6* και *TNF α* και παράλληλα μείωση του *TLR4* και του μεταγραφικού παράγοντα *NF κ B1* (Liu et al., 2019a).

Παράλληλα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2020 με ΜΑΕ από τζίντζερ, βάλσαμο λεμονιού, ρίγανη και θυμάρι παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των *TLR4* και του *NF κ B1* στο δωδεκαδάκτυλο και στα τυφλά στις συγκεντρώσεις ΜΑΕ 1000, 2000 mg/kg σιτηρεσίου (Mountzouris et al., 2020). Επίσης, σε πείραμα που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα γλυκόριζας σε σκόνη καθώς αυξανόταν η ποσότητά του τόσο μειωνόταν η γονιδιακή έκφραση των *TLR4* και *IL1- β* στη νήστιδα ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Ίδια μείωση του *TLR4* παρατηρήθηκε στα τυφλά έντερα ορνιθίων με προσθήκη πικραλίδας και αστραγάλου (Liang et al., 2021).

Κατά την προσθήκη βιολογικού πυρήνα cranberry στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγών ορνιθίων τα γονίδια που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία *IFN- γ* , *MyD88* και *TLR3* μειώθηκαν σημαντικά στο ήπαρ ενώ στο θύλακα του Fabricius σημειώθηκε αύξηση του αντιφλεγμονώδους γονιδίου *IL10* (Das et al., 2021). Παράλληλα σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης *IL6* με την προσθήκη ΜΑΕ

καρβακρόλης, ανηθόλης και λιμονένιου στη νήστιδα και στον ειλεό (Wang et al., 2021). Παράλληλα σε πείραμα που τα ορνίθια προσβλήθηκαν με νεκρωτική εντερίτιδα το MAE καρβακρόλης, θυμόλης και οργανικών οξέων σε συγκεντρώσεις 200 και 500 μείωσαν σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση των *TLR2*, *TLR4*, *IFN γ* και *NFKB1* στο επιθήλιο της νήστιδας (Pham et al., 2022). Τέλος ο Chalana και οι συνεργάτες του το 2022 παρατήρησαν μια σημαντική μείωση του *TLR2* και μια αύξηση του *TLR4* με την προσθήκη μαύρου πιπεριού (*Piper nigrum*) σε σκόνη το οποίο να είναι συνέπεια της αυξημένης ανάπτυξης των Gram-θετικών βακτηρίων (*Lactobacillus* spp) και της μειωμένης ανάπτυξης Gram-αρνητικών (*E. coli*) βακτηρίων στα ορνίθια (Chalana et al., 2022).

Αυτή η πτωτική τάση της γονιδιακής έκφρασης των *TLRs* και των γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση, είναι πολύ σημαντική για τον περιορισμό της και υπάρχουν ενδείξεις από τις μελέτες που προαναφέρθηκαν ότι τα ΦΒΣ μπορεί να παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση (Kikusato, 2021). Οι *MAPKs* είναι μια ομάδα πρωτεϊνικών κινασών που ρυθμίζουν τις κυτταρικές δραστηριότητες. Μεταξύ των *MAPKs*, η πρωτεϊνική κινάση *p38*, η εξωκυτταρική πρωτεϊνική κινάση ρυθμιζόμενη με σήμα (*ERK1/2*) και η N-τερματική κινάση *c-Jun* έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με τη ρύθμιση της φλεγμονής και της ανοσίας ως απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες. Η ενεργοποίηση των *TLRs* και του *NF κ B* οδηγεί στην επαγωγή του μονοπατιού του *MAPK*. Ο Huang & Lee, 2018 εξέτασαν ότι τα φυτογόνα, όπως η ρίγανη, η κανέλα, ο κουρκουμάς και το θυμάρι, είναι σε θέση να ρυθμίζουν τις χυμικές αποκρίσεις σε ορνίθια και χοίρους. Τα κύρια συστατικά τους έχουν αναφερθεί ότι ρυθμίζουν τα μονοπάτια σηματοδότησης *NF κ B* και/ή *MAPKs* σε τρωκτικά (C. M. Huang & Lee, 2018).

Παρόλα αυτά οι μελέτες για τα φυτογόνα αυτά στο *MAPK* μονοπάτι όσον αφορά τα μονογαστρικά ζώα επικεντρώνονται στους χοίρους και όχι στα ορνίθια. Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την προστατευτική δράση του MAE με βασικό συστατικό την καρβακρόλη έναντι της φλεγμονής στη νήστιδα των χοίρων, μελετήθηκε και το μονοπάτι των *MAPKs*. Όπως παρατηρήθηκε στη νήστιδα, η προσθήκη του συγκεκριμένου ΦΒΣ ανέστειλε την ενεργοποίηση των *JNK*, *ERK1/2* και *Akt* (Zou et al., 2016). Επιπροσθέτως ο Pannee και οι συνεργάτες του το 2014 ανέφεραν ότι η προσθήκη ελαίου κανέλας καθώς και η κινναμαλδεΰδη μείωσαν σημαντικά την έκφραση των επαγωγίμων ενζύμων της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου, της

κυκλοοξυγενάσης-2 (COX2) που ανήκει στο μονοπάτι των MAPKs (Pannee et al., 2014).

Παράλληλα, η προσθήκη ελαιορητήνης κουρκουμά εξουδετέρωσε τις επιδράσεις του *E. coli*, όπως υποδεικνύεται από την αξιοσημείωτη επίδραση στην έκφραση mRNA της *IL-1β*, της βλεννίνης 2 (*MUC2*), του *COX2* και του *p38 MAPK* στον βλεννογόνο του ειλεού των χοίρων (Liu et al., 2014). Επιπροσθέτως, η θυμόλη, το ισομερές της καρβακρόλης, ανέστειλε τη φωσφορυλίωση των *NFκB* και *MAPKs* και μείωσε την παραγωγή των *IL-6*, *TNF-α*, *iNOS* και *COX-2* σε επιθηλιακά κύτταρα ποντικού προσβαλλόμενα από LPS(Liang et al., 2014).

Όσον αφορά το μονοπάτι της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού (*PI3K-Akt-mTOR* μονοπάτι) αναφέρονται στον **πίνακα 2.8** διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με τους βιοδείκτες του μονοπατιού *PI3K-Akt-mTOR* και κατά πόσο αυτοί επηρεάστηκαν με την προσθήκη ΦΒΣ στο σιτηρέσιο των ορνιθίων.

Πίνακας 2.8. Επίδραση ΦΒΣ σε βιοδείκτες που σχετίζονται με το *PI3K-Akt-mTOR* μονοπάτι.

ΦΒΣ	Δοσολογία	Ιστός	Βιοδείκτες	Βιβλιογραφική Αναφορά
Μείγμα ρεβυθιού, φασολιών/ μείγμα με αχυρανθές, νεροϊτιά, γκουντούτσι/ φυτικό αυξητικό παράγοντα με σκόρδο, πιπερόριζα, ραδίκι, έλαιο ευκαλύπτου κ.α.	0.55 g/kg σιτηρεσίου	Ηπατικός, κοιλιακός λιπώδης, μείζονας θωρακικός μυϊκός	↑ mTOR ↑ S6K1 ↑ AMPK (στο μυϊκό ιστό)	Flees et al., 2021b
Εταιρικά πολυβοτανικά σκευάσματα προτυποποιημένων, ελεγμένων βοτάνων	συμπληρωμένο στο πόσιμο νερό με ρυθμό 2, 4 και 7 mL/100 ορνιθίων /ημέρα ανά φάση ανάπτυξης	Ηπατικός, κοιλιακός λιπώδης, μείζονας θωρακικός μυϊκός	↑ mTOR (στο μυϊκό ιστό)	Flees et al., 2021a

Το μονοπάτι της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού (*PI3K-Akt-mTOR* μονοπάτι) όπως παρατηρείται από τον πίνακα δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς στα ορνίθια με την προσθήκη των ΦΒΣ. Η ομάδα του Flees παρατήρησε το μονοπάτι του μεταβολισμού στο ήπαρ, στον κοιλιακό λιπώδη ιστό και στο θωρακικό μυϊκό ιστό με την προσθήκη διάφορων ειδών ΦΒΣ. Στις μελέτες τους διαφοροποιήθηκαν στον τρόπο χορήγησης. Στην πρώτη τα ΦΒΣ προστέθηκαν στο σιτηρέσιο ενώ στη δεύτερη συμπληρώθηκαν στο πόσιμο νερό των ορνιθίων. Στην πρώτη μελέτη παρατηρήθηκαν περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εκφράσεις των γονιδίων τα οποία αυξήθηκαν με την προσθήκη ΦΒΣ (*mTOR, S6K1, AMPK*; J. J. Flees, Ganguly, et al., 2021). Παράλληλα στην δεύτερη μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση του *mTOR* με την προσθήκη του ΦΒΣ στο μυϊκό ιστό (Flees et al., 2021a).

Το μονοπάτι *mTOR* έχει πολλές συνδέσεις με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης για τη ρύθμιση όλων των λειτουργιών του οργανισμού. Το μονοπάτι αυτό φαίνεται να ρυθμίζει τις βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού των λιπιδίων, της αυτοφαγίας, της πρωτεϊνικής σύνθεσης και της βιογένεσης ριβοσωμάτων. Επίσης, πολλές λειτουργίες ομοιόστασης της ενέργειας ρυθμίζονται μέσω του μονοπατιού *mTOR* (te Pas et al., 2020). Για τους παραπάνω λόγους το μονοπάτι αυτό θεωρείται κρίσιμο να διερευνηθεί στα ορνίθια κρεοπαραγωγής καθώς θα αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς δράσης των ΦΒΣ στα παραγωγικά χαρακτηριστικά.

2.3. Ξενοβιοτικά

Ξενοβιοτικά είναι όλες οι χημικές ενώσεις που βρίσκονται σε έναν ζωντανό οργανισμό, αλλά είναι ξένες προς αυτόν, με την έννοια ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν παράγει την ένωση ή δεν την καταναλώνει ως μέρος της διατροφής του (Kennedy and Tierney, 2012). Για παράδειγμα, στους ανθρώπους, τα περισσότερα φάρμακα ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, καθώς οι άνθρωποι δεν τα παράγουν φυσικά ή δεν τα καταναλώνουν υπό κανονικές συνθήκες. Τα ξενοβιοτικά μπορούν επίσης να οριστούν ως ουσίες που υπάρχουν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις κανονικές ή ως ουσίες που είναι εξ ολοκλήρου τεχνητές και δεν υπήρχαν πριν παραχθούν συνθετικά από τον άνθρωπο (Patel and Jyoti Sen, 2013). Η παρουσία ξενοβιοτικών στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ομοιόστασης του οργανισμού (Guzmán-Mejía et al., 2021). Κάποια παραδείγματα ξενοβιοτικών είναι οι μυκοτοξίνες, τα φάρμακα, τα φυτοφάρμακα, τα καλλυντικά, τα αρώματα, τα πρόσθετα τροφίμων, οι βιομηχανικές χημικές ουσίες καθώς και οι περιβαλλοντικοί ρύποι (Patterson et al., 2010).

2.3.1. Μυκοτοξίνες και ορνίθια κρεοπαραγωγής

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων που ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Claviceps* και *Penicillium*. Περισσότερες από 400 μυκοτοξίνες έχουν αναφερθεί σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Οι πιο συχνά ανιχνευόμενες και ανησυχητικές παγκοσμίως είναι η αφλατοξίνη B1 (AFB1), η αφλατοξίνη B2 (AFB2), η αφλατοξίνη G1 (AFG1) και η αφλατοξίνη G2 (AFG2), οι φουμονισίνες (FUM), τα τριχοθηκένια (για παράδειγμα, δεοξυनिβαλενόλη (DON) και τοξίνη T-2 (T-2). και η ωχρατοξίνη A (OTA). Αυτές οι τοξίνες αναφέρεται ότι προκαλούν οικονομικές απώλειες, ασθένειες, ακόμη και θάνατο ανθρώπων και ζώων (Ochieng et al., 2021).

Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών ξεκινούν στην καλλιέργεια, κατά τη μεταφορά ή την αποθήκευση και επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των εποχών, της τοποθεσίας που καλλιεργούνται τα σιτηρά, της ξηρασίας και του χρόνου συγκομιδής. Επίσης, καθένα από τα δημητριακά και τους ελαιούχους σπόρους που διατίθενται στις τροφές πουλερικών είναι φυτικές ουσίες που λαμβάνονται σε διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της βλάστησης, στην καλλιέργεια, στη μεταφορά και στην αποθήκευση. Για το λόγο αυτό, πολλαπλοί τύποι μυκοτοξινών μπορεί να βρεθούν σε μικτές ζωοτροφές. Τέτοια

παραδείγματα σύνθετης επιμόλυνσης στις ζωοτροφές ορνιθίων είναι τα εξής: παρουσία αφλατοξίνης με ωχρατοξίνες, τοξίνη T-2 με διακετοξυσκιρπενόλη, ωχρατοξίνες με τοξίνη T-2 και εμετοξίνη με φουμαρικό οξύ στις τροφές ορνιθίων (Filazi et al., 2017). Στον πίνακα φαίνονται οι κυριότεροι τύποι μυκοτοξινών, τα είδη των μυκήτων ανάλογα με τη μυκοτοξίνη, τα διατροφικά σκευάσματα που μολύνουν και τα σημαντικότερα όρια των μυκοτοξινών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) στα επίπεδα ζωοτροφών (Agriopoulou et al., 2020).

Πίνακας 2.9. Τύποι και ακρωνύμια μυκοτοξινών, είδη μυκήτων ανάλογα με τη μυκοτοξίνη, διατροφικά σκευάσματα που μολύνουν και τα σημαντικότερα όρια των μυκοτοξινών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) στα επίπεδα τροφίμων και ζωοτροφών (Agriouroulou et al., 2020)

Μυκοτοξίνη	Ακρωνύμιο	Είδος μύκητα	Εμπορεύματα διατροφής	ΕΥ (μg/kg)
Αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2	AFB1 AFB2 AFG1 AFG2	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus</i>	Αραβόσιτος, σιτάρι, ρύζι, φιστίκι, σόργο, φιστίκι, αμύγδαλο, ξηροί καρποί, σύκα, βαμβάκι, μπαχαρικά	2–12 για B1 4–15 συνολικά
Αφλατοξίνη M1	AFM1	Μεταβολίτες της B1	Γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας	0.05 στο γάλα 0.025 στη βρεφική φόρμουλα και στο γάλα
Ωχρατοξίνη A	OTA	<i>Aspergillus ochraceus, Aspergillus carbonarius Penicillium verrucosum, Penicillium nordicum</i>	Δημητριακά, αποξηραμένα σταφύλια, κρασί, σταφύλια, καφές, κακάο, τυρί	2–10
Φουμονισίνες B1, B2, B3	FB1 FB2 FB3	<i>Fusarium verticillioides, Fusarium proliferatum</i>	Αραβόσιτος, προϊόντα αραβοσίτου, σόργο, σπαράγγια	200–4000
Ζεαραλενόνη	ZEN	<i>Fusarium graminearum (F. roseum), Fusarium culmorum Fusarium equiseti, Fusarium cerealis, Fusarium verticillioides, Fusarium incarnatum</i>	Δημητριακά, προϊόντα δημητριακών, αραβόσιτος, σιτάρι, κριθάρι	20–100
Τριχοθηκένια (τύπος B: δεοξυνιβαλενόλη)	DON	<i>Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium cerealis</i>	Δημητριακά, προϊόντα δημητριακών	200–500

Πατουλίνη	PAT	<i>Penicillium expansum</i> <i>Byssochlamis nivea</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Penicillium patulum</i> <i>Penicillium crustosum</i>	Μήλα, χυμός μήλου, αχλάδια, ροδάκινα, σταφύλια, βερίκοκα, χυμοί φρούτων με χαμηλή οξύτητα, ελιές	10–50
Τριχοθηκένια (τύπος A: HT-2)	HT2	<i>Fusarium langsethiae</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι, βρόμη, σίκαλη	25–1000
Τριχοθηκένια (τύπος A: Τοξίνη T-2)	T-2	<i>Fusarium langsethiae</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι, βρόμη, σίκαλη	25–1000
Εννιατίνες	ENNs	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium avenaceum</i>	Καλαμπόκι	Δεν έχει οριστεί
Εργοταλκαλοειδή	EAs	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>Claviceps fusiformis</i> , <i>Claviceps africana</i> , <i>Neotyphodium spp</i>	Σίκαλη, προϊόντα που περιέχουν σίκαλη, σιτάρι, τριτικά, κριθάρι, κεχρί και βρόμη	Δεν έχει οριστεί
Αλτερναριόλη	AOH	<i>Alternaria alternata</i>	Προϊόντα με βάση τα σιτηρά, τα λαχανικά και τα φυτικά προϊόντα, φρούτα και προϊόντα φρούτων, κρασί και μύρα, ελαιούχοι σπόροι και φυτικά έλαια	Δεν έχει οριστεί

Οι μυκοτοξίνες μεταβολίζονται στον εντερικό σωλήνα, στο ήπαρ ή στα νεφρά των πτηνών σύμφωνα με τις χημικές τους ιδιότητες. Η μεταφορά τους στο κρέας των πτηνών και στα αυγά οδηγεί σε ανεπιθύμητες επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων, δημιουργώντας προβλήματα στη δημόσια υγεία. Η μόλυνση των ζωοτροφών με μύκητες βλάπτει τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες και αυξάνει τον κίνδυνο δηλητηρίασης μειώνοντας τη θρεπτική τους αξία. Η τοξικότητα των μυκοτοξινών εξαρτάται από την ποσότητα απορρόφησης, τον αριθμό των μεταβολιτών που σχηματίζονται, την περίοδο έκθεσης και την ευαισθησία του ζώου. Ορισμένες μυκοτοξίνες όπως οι αφλατοξίνες (AF), η ωχρατοξίνη Α (OTA), οι φουμονισίνες (FUM), η δεοξυνιβαλενόλη (DON) και η τοξίνη T-2 επηρεάζουν σημαντικά την υγεία και την παραγωγικότητα των πτηνών (Filazi et al., 2017). Στον **πίνακα 2.10** παρουσιάζονται μελέτες για την επίδραση των μυκοτοξινών στις ζωοτεχνικές παραμέτρους των ορνιθίων.

Πίνακας 2.10. *Επίδραση των μυκοτοξινών στις ζωοτεχνικές παραμέτρους. Παρουσιάζονται το είδος της μυκοτοξίνης, οι επιδράσεις στα παραγωγικά χαρακτηριστικά.*

Μυκοτοξίνη	Κ.Τ.	Ρ.Α.Σ.Β.	Σ.Ε.Τ.	Βιβλιογραφία
Αφλατοξίνη 7,4 µg/kg, ωχρατοξίνη 10,0 µg/kg, T-2 79,8 µg/kg, φουμονισίνη 700 µg/kg, ζεαραλεόνη 100 mg/kg και εμετοξίνη, 0,8 mg/kg	-	↓	↑	Wang et al., 2006
Δεοξυνιβαλενόλη (DON)	-	↓	↑	Wang and Hogan, 2019
Δεοξυνιβαλενόλη (DON), ζεαραλεόνη (ZEN), φουμονισίνες (FUM), απισιδίνη	-	-	↑	Kolawole et al., 2020
Υπόλειμμα που παραμένει μετά το κλάσμα αμύλου του	-	↓	↑	Weaver et al., 2020

Πρόσφατη έρευνα το 2020 από τον Kolawole και τους συνεργάτες του υποστήριξε ότι ακόμα και χαμηλές δόσεις μιγμάτων μυκοτοξινών κάτω από τα όρια της ΕΕ μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η παρατεταμένη έκθεση τους μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τον συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής των ορνιθίων. Ακόμα, τα αποτελέσματά υποδεικνύουν την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση των μυκοτοξινών στις ζωοτροφές και περαιτέρω αξιολόγηση των επιπτώσεων στην υγεία καθότι μπορεί να μην προκαλούν εμφανή κλινικά σημάδια στα ζώα εκτροφής, αλλά μπορεί να τα προδιαθέσουν σε συστηματικές διαταραχές και να μειώσουν τα παραγωγικά χαρακτηριστικά (Kolawole et al., 2020).

Σύμφωνα με μια μετα-αναλυτική έρευνα τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που κατανάλωσαν μυκοτοξίνες είχαν σημαντικά χαμηλότερο ($P < 0,001$) μέσο ολικό ΡΑΣΒ κατά 217,20 γραμμάρια από τα ορνίθια που τρέφονταν με σιτηρέσια χωρίς μυκοτοξίνες. Από τις 33 μελέτες οι 30 υπέδειξαν ότι τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με επεμβάσεις που περιείχαν μυκοτοξίνες είχαν σημαντικά χαμηλότερο ΡΑΣΒ από τα ορνίθια που τρέφονταν χωρίς μυκοτοξίνες. Καμία δοκιμή δεν έδειξε αύξηση στο ΡΑΣΒ για πτηνά που τρέφονται με μυκοτοξίνες και μόνο 3 από τις 33 μελέτες δεν οδήγησαν σε διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων. Η συνολική ΚΤ ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερη ($P < 0,001$) κατά 264,44 γραμμάρια για τα πτηνά που τρέφονταν με μυκοτοξίνες έναντι των πτηνών που τρέφονταν με σιτηρέσιο χωρίς μυκοτοξίνες (Weaver et al., 2022).

Στη συνέχεια της ανάλυσης παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των μυκοτοξινών στον ΣΕΤ. Τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο με μυκοτοξίνες είχαν 0,12 αύξηση στον ΣΕΤ σε σχέση με αυτά που τρέφονταν με σιτηρέσιο μάρτυρα ($P < 0,001$). Η θνησιμότητα ήταν 2,07% μεγαλύτερη ($P < 0,001$) μεταξύ των πτηνών που τρέφονταν με μυκοτοξίνες. Οι τιμές του ΣΕΤ ήταν σημαντικά υψηλότερες για τα πτηνά που τρέφονταν με μυκοτοξίνες σε 23 από τις 34 συγκρίσεις επεμβάσεων και μόνο μία από τις 34 συγκρίσεις έδειξε ότι οι μυκοτοξίνες μειώνουν τον ΣΕΤ. Το ποσοστό θνησιμότητας ήταν υψηλότερο σε 11 από τις 15 συγκρίσεις επεμβάσεων (Weaver et al., 2022).

Μία από τις κοινές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της μυκοτοξίκωσης στα ορνίθια είναι η χρήση φυτικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των αιθέριων ελαίων, είτε ως απολυμαντικό φυτικής προέλευσης στην αποθήκευση ζωοτροφών είτε ως φυτικό μη αντιβιοτικό πρόσθετο ζωοτροφών. Καθώς τα φαινολικά φυτοχημικά έχουν αντιοξειδωτική δράση σε διάφορους βαθμούς λόγω των διαφόρων χημικών τους δομών, θεωρείται ότι έχουν προστατευτικό ρόλο στα κυτταρικά συστατικά έναντι της βλάβης που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες που προκαλείται από μυκοτοξικώσεις (Filazi et al., 2017). Για παράδειγμα, ένα φυτικό δεσμευτικό μυκοτοξίνης που αποτελείται από ένα συνδυασμό μεταλλικών στοιχείων, αντιοξειδωτικών και ενζύμων αποκατέστησε μερικώς την κατανάλωση τροφής και την παραγωγή αυγών, μειώνοντας ορισμένες παρενέργειες της αφλατοξίνης σε εκτροφείς ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Manafi and Khosravinia, 2013).

2.3.2. Επίδραση μυκοτοξινών στον εντερικό φραγμό

Οι διαταραχές στην έκφραση των βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό οδηγούν σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Το εντερικό επιθήλιο είναι η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και είναι πολύ ευαίσθητο στις τοξίνες του γένους *Fusarium*, ιδιαίτερα στη δεοξυνιβαλενόλη (DON) και τη ζεαραλενόνη (ZEA). Οι μυκοτοξίνες είναι γνωστό ότι είναι επιβλαβείς για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων, παρόλα αυτά η επίδρασή τους στην έκφραση των TJs εξακολουθεί να είναι άγνωστη. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι όχι μόνο οι μυκοτοξίνες αλλά και οι μεταβολίτες τους ενδέχεται να συμμετέχουν στη δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού. Τα τελευταία χρόνια, οι κλαουδίνες κεντρίζουν το ενδιαφέρον λόγω των διαγνωστικών και θεραπευτικών δυνατοτήτων τους. Η κατανόηση της σύνδεσης μεταξύ μυκοτοξινών και κλαουδινών μπορεί να δώσει νέες επιλογές για την προστασία του γαστρεντερικού σωλήνα (Kozieł et al., 2021).

Πίνακας 2.11. Επίδραση των μυκοτοξινών στους βιοδείκτες του εντερικού φραγμού.

Μυκοτοξίνες	Όργανο	Μονοπάτι εντερικού φραγμού	Βιβλιογραφία
<i>Δεοξυνιβαλενόλη</i>	Δωδεκαδάκτυλος, νήστιδα ορνιθίων	↓ ZO1, OCLN, CLDN1	Wan et al., 2022a
<i>Φουμονισίνες</i>	Νήστιδα ορνιθίων	↓ ZO1, CLDN3	Tomaszewska et al., 2021
<i>Αφλατοξίνη B1</i>	Εντερικά επιθηλιακά κύτταρα χοίρου	↓ ZO1, OCLN, CLDN3, MUC2	Zhang et al., 2022a
<i>Φουμονισίνες και δεοξυνιβαλενόλη</i>	Νήστιδα ορνιθίων	↓ ZO1, CLDN1, CLDN2	Shanmugasundaram et al., 2022
<i>Φουμονισίνες και δεοξυνιβαλενόλη</i>	Δωδεκαδάκτυλος ορνιθίων	↓ MUC2	Antonissen et al., 2015

Από τον παραπάνω πίνακα (2.11) παρατηρείται η μείωση των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου με οποιαδήποτε μυκοτοξίνη και αν προστέθηκε ακόμα και στα επιτρεπτά από την ΕΕ όρια (Antonissen et al., 2015).

2.3.3. Επίδραση μυκοτοξινών στην αποτοξίνωση και στην αντιοξειδωτική απόκριση

Η τοξικότητα που προκαλείται από τη σύνθεση των μυκοτοξινών στην τροφή θα μπορούσε να οδηγήσει σε οξειδωτική καταπόνηση και φλεγμονή που με τη σειρά της επηρεάζει την αρνητικά απόδοση των ορνιθίων όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο και την υγεία. Για να κατανοηθούν οι μηχανισμοί δράσης των μυκοτοξινών στις παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων πρέπει να αναλυθούν οι επιδράσεις των μυκοτοξινών επί των μονοπατιών που σχετίζονται με την αποτοξίνωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα (Liu et al., 2019b).

Οι μυκοτοξίνες είναι γνωστό ότι προκαλούν εντερική τοξικότητα προκαλώντας οξειδωτική καταπόνηση (Marin et al., 2017). Το θέμα των επιδράσεων της μυκοτοξίνης και των μεταβολιτών της μυκοτοξίνης στο μονοπάτι σηματοδότησης του AHR και στη μεταγραφή των γονιδίων του έχει εξεταστεί από λίγες μόνο μελέτες. Φάνηκε ότι διαφορετικοί τύποι μυκοτοξινών και οι μεταβολίτες τους προκάλεσαν την αύξηση της έκφρασης των ενζύμων AHRs και CYPs κυρίως στο ήπαρ των ορνιθίων (Muhammad

et al., 2017; Liu et al., 2019b; Ates and Ortatatli, 2021). Οι επιδράσεις των μυκοτοξινών στο μονοπάτι AHR στο έντερο των ορνιθίων δεν έχουν διερευνηθεί αρκετά.

Παράλληλα, οι επιδράσεις των μυκοτοξινών στη ρύθμιση του μονοπατιού Nrf2 και των σχετικών γονιδίων του έχουν μελετηθεί περισσότερο σε σύγκριση με το μονοπάτι AHR στα ορνίθια (Πίνακας 2.12). Οι μυκοτοξίνες ανέστειλαν την αντιοξειδωτική απόκριση μέσω της μείωσης του Nrf2 και της έκφρασης των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων της Φάσης II στο ήπαρ των πτηνών (Liu and Wang, 2016; Wang et al., 2018), στο σπλήνα (Rajput et al., 2019), στα νεφρά (Li et al., 2020) και στο έντερο (Tong et al., 2020). Σε όργανα όπως τα νεφρά και το έντερο, οι επιδράσεις των μυκοτοξινών στην κυτταρική αντιοξειδωτική απόκριση μπορεί να εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους και την περίοδο έκθεσης. Τέλος, δεν υπάρχουν μελέτες που να διερευνούν τις επιδράσεις των μυκοτοξινών συλλογικά και για τα δύο μονοπάτια.

Πίνακας 2.12. Μελέτες που αφορούν τα μονοπάτια AHR και Nrf2 σε πτηνά με την προσθήκη μυκοτοξινών.

Μυκοτοξίνες	Όργανο	AHR μονοπάτι	Nrf2 μονοπάτι	Βιβλιογραφία
<i>Αφλατοξίνες</i>	Ήπαρ	-----	↓Nrf2, NQO1, SOD, HO-1	(Liu and Wang, 2016)
<i>Αφλατοξίνες</i>	Ήπαρ	↑ CYP2A6	-----	(Muhammad et al., 2017)
<i>Αφλατοξίνες</i>	Ήπαρ	-----	↓Nrf2, GSTs	(Wang et al., 2018)
<i>T-2 τοξίνη του γένους Fusarium</i>	Ήπαρ	↑AHR, CYP1A5	-----	(Liu et al., 2019b)
<i>Αφλατοξίνες</i>	Σπλήνας	-----	↓ Nrf2, HO-1, NQO1, GPx	(Rajput et al., 2019)
<i>Ωχρατοξίνη A</i>	Νεφρά	-----	↓Nrf2, CAT, SOD, HO-1	(Li et al., 2020)
<i>Ωχρατοξίνη A</i>	Δωδεκαδάκτυλος, νήστιδα, ειλεός	-----	↓ Nrf2, HO-1	(Tong et al., 2020)

<i>Αφλατοξίνες</i>	Ήπαρ	↑AHR, CYP1A1, CYP2A6	-----	(Ates and Ortatatli, 2021)
--------------------	------	----------------------------	-------	-------------------------------

2.3.4. Επίδραση μυκοτοξινών στην ανοσιακή απόκριση, στην απόπτωση και στην πρωτεϊνοσύνθεση

Έχουν περιγραφεί βλαβερές επιδράσεις των μυκοτοξινών στο γαστρεντερικό σωλήνα λόγω της κατάποσης μολυσμένων τροφών, οι οποίες συνήθως εκδηλώνονται ως φλεγμονή, νεκρωτικές αλλαγές, βλάβη στη λειτουργία του εντερικού φραγμού, εξασθένηση της εκκριντικής δραστηριότητας και μεταβολές στον μεταβολισμό των εντεροκυττάρων. Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου και είναι απαραίτητο για την προστασία των ζωντανών οργανισμών από παθογόνα όπως μούχλα και μυκοτοξίνες. Η έμφυτη και επίκτητη ανοσολογική απόκριση είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική και επιτυχή εξάλειψη μολυσματικών παθογόνων και τοξικών μεταβολιτών. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να διαταραχθούν ως απόκριση σε αντιγόνα μυκητιακών κυτταρικών τοιχωμάτων ή ανοσοτροποποιητικές και ανοσοτοξικές δράσεις των μυκοτοξινών και επομένως είναι κρίσιμοι για την ανάπτυξη ή την έξαρση ασθενειών που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Kraft et al., 2021).

Οι ανοσολογικές μεταβολές μπορούν να προκαλέσουν την έκφραση πολλών προφλεγμονωδών κυτοκινών από μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs), ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρογλοιακά κύτταρα και νευρώνες στον υποδοχέα τύπου Toll 4 (TLR4), τον πυρηνικό παράγοντα NFκB1 και στις εξαρτώμενες από το μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs; Guo et al., 2013). Τέτοια μη ισορροπημένη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού μπορεί είτε να προκαλείται από μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνο (PAMPs) είτε από μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με βλάβη (DAMPs) αυξάνοντας τις κυτοκίνες (TNFα, IL-6, IL-17 και IL-1β) και τα ανοσοκύτταρα (Kraft et al., 2021).

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες στα ορνίθια τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί η καταστροφική επιρροή των μυκοτοξινών στα παραγωγικά χαρακτηριστικά (Wang and Hogan, 2019; Kolawole et al., 2020; Weaver et al., 2020), χωρίς βέβαια να έχει αποτυπωθεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης πίσω από την αρνητική επίδραση στα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Αντιθέτως, στους χοίρους, στα ποντίκια και στους

ανθρώπους έχουν μελετηθεί περαιτέρω οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης που αφορούν την εντερική υγεία και λειτουργία (Özcan et al., 2015; Zhu et al., 2017; Chen et al., 2022).

Παρακάτω θα αναφερθούν ορισμένες μελέτες που αφορούν την επίδραση συγκεκριμένων μυκοτοξινών στους μοριακούς μηχανισμούς των μονοπατιών των TLR, mTOR και MAPKs στους χοίρους, στα ποντίκια και στους ανθρώπους. Η ωχρατοξίνη επάγει την κυτταρική απόπτωση και σε *in vivo* πειράματα και σε *in vitro*. *In vivo*, η απόπτωση βρέθηκε στα νεφρά ποντικών και αρουραίων ενώ *in vitro*, στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, κυρίως μέσω των μονοπατιών σηματοδότησης ERK1/2, p38, MAPK και JNK (Zhu et al., 2017). Η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, δηλαδή του μονοπατιού mTOR, είναι επίσης ένας από τους κύριους μηχανισμούς που προκαλείται από την ωχρατοξίνη (Zhu et al., 2017). Επίσης, άλλη μελέτη έδειξε ότι σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα μετά από έκθεση σε ωχρατοξίνη παρατηρήθηκε συνεχής ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης PI3K/Akt και MAPK (Özcan et al., 2015). Όλα αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η απόπτωση και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι ένας από τους τρόπους κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από την ωχρατοξίνη. Έχει αναφερθεί ότι το όργανο-στόχος της ωχρατοξίνης είναι ο νεφρός, επομένως η νεφροτοξικότητα είναι ιδιαίτερα εμφανής. Βλάβη του εγγύς σωληναριακού διάμεσου μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε ζώα που τρέφονται με ζωοτροφές που περιέχουν ωχρατοξίνη, με αποτέλεσμα σοβαρή νεφρική τοξικότητα και ακόμη και νεφρικούς όγκους σε σοβαρές περιπτώσεις τοξικότητας (Chen et al., 2022).

3. Κεφάλαιο 3- ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή η διασφάλιση και βελτίωση των παραγωγικών αποδόσεων των πτηνών είναι στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Οι παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων κρεοπαραγωγής εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ακεραιότητα και λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος. Οι τελευταίες φαίνεται να επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων με αποτέλεσμα να υπάρχει έλλειμα γνώσης ως προς το ποιοι μηχανισμοί εμπλέκονται και πως κατανέμονται κατά μήκος του εντέρου. Για την ενεργοποίηση και την σε βάθος διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών δράσεως, η διατροφή αποτελεί παράγοντα μείζονος σημασίας, η στοχευμένη μελέτη του οποίου αναμένεται να δώσει νέα στοιχεία για την ακεραιότητα λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων (**Σχήμα 13**).

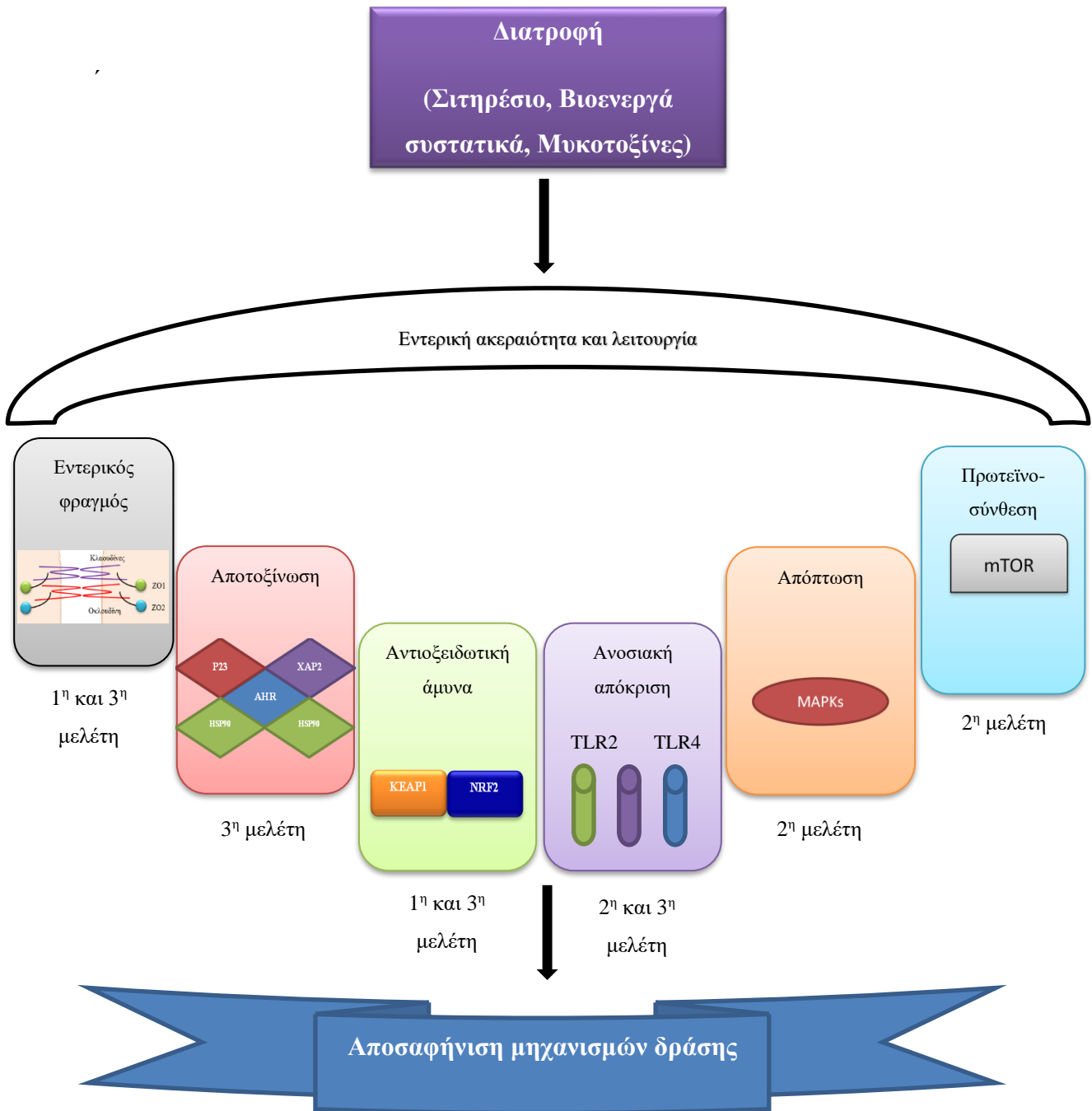
Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής (ΔΔ) ήταν να αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς δράσης κάποιων διατροφικών αλλαγών αλλά και την παρουσία ξενοβιοτικών στον εντερικό σωλήνα κρεοπαραγωγών ορνιθίων μελετώντας μια σειρά επιλεγμένων εντερικών μοριακών βιοδεικτών, εμπλεκόμενων σε σημαντικά μοριακά μονοπάτια για την εντερική ακεραιότητα, λειτουργία και υγεία, παρακολουθώντας παράλληλα και τις παραγωγικές τους αποδόσεις.

Με βάση προηγούμενες ερευνητικές εργασίες (Paraskeuas and Mountzouris, 2019b; Mountzouris et al., 2020) καθώς και βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε, αναδείχθηκαν σημαντικά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με κρίσιμους μηχανισμούς για την εντερική ομοιοστασία και συγκεκριμένα :

- τον εντερικός φραγμό
- την αποτοξίνωση
- την αντιοξειδωτική άμυνα
- τη φλεγμονώδη απόκριση
- την κυτταρική απόπτωση
- την πρωτεϊνοσύνθεση

Στο πλαίσιο αυτό για την υλοποίηση του σκοπού της ΔΔ διενεργήθηκαν 2 πειραματικές μελέτες που παρουσιάζονται σε 3 επιμέρους κεφάλαια:

1. Στόχος της 1^{ης} μελέτης (Κεφάλαιο 4) ήταν να δημιουργήσει νέα γνώση σχετικά με τις επιδράσεις των επιπέδων διατροφικής ενέργειας (ΜΕ) και ολικής πρωτεΐνης (ΟΠ) με ή χωρίς προσθήκη ενός ΦΒΣ το οποίο για το σκοπό της μελέτης αυτής θα ονομαστεί ΦΒΣ1 στη διαμόρφωση του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2/ARE στον βλεννογόνο του εντέρου των ορνιθίων. Το μονοπάτι αυτό σχετίζεται με την αντιοξειδωτική άμυνα.
2. Ο σκοπός της 2^{ης} μελέτης (Κεφάλαιο 5) σε συνέχεια της 1^{ης} ήταν να εμβαθύνει περισσότερο και να διερευνήσει τις διατροφικές αλλαγές της 1^{ης} μελέτης σε ορισμένους βιοδείκτες που εμπλέκονται σε μονοπάτια που σχετίζονται με τον έλεγχο της φλεγμονής, την κυτταρική απόπτωση, τη σύνθεση πρωτεϊνών και τον μεταβολισμό στο έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής.
3. Η 3^η μελέτη (Κεφάλαιο 6) είχε σκοπό να αξιολογήσει μια σειρά επιλεγμένων εντερικών μοριακών βιοδεικτών για την ανταπόκρισή της στα μέγιστα επιτρεπόμενα από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) διατροφικά επίπεδα δεοξινυβαλενόλης (DON) και φουμονισινών (FUM). Για τους σκοπούς της μελέτης, διαμορφώθηκε ένα δύσπεπτο σιτηρέσιο και μετρήθηκαν οι βιοδείκτες που σχετίζονται με την αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, τη φλεγμονή και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων.



Σχήμα 13. Σχηματική απεικόνιση των κρίσιμων μηχανισμών της εντερικής ακεραιότητας και λειτουργίας που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας ΔΔ.

4. Κεφάλαιο 4- Επιδράσεις του σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής

4.1. Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να δημιουργήσει νέα γνώση σχετικά με τις επιδράσεις των επιπέδων διατροφικής ενέργειας και πρωτεΐνης με ή χωρίς προσθήκη ΦΒΣ (ΦΒΣ1) στη διαμόρφωση του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2/ARE στον βλεννογόνο του εντέρου των ορνιθίων. Για τους σκοπούς της μελέτης, η έκφραση κρίσιμων γονιδίων που ανήκουν στο μονοπάτι Nrf2/ARE καταγράφηκε κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Εκτός από τις γονιδιακές εκφράσεις, αξιολογήθηκε βιοχημικά η αντιοξειδωτική ικανότητα του εντερικού βλεννογόνου.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1. Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις

Για τους σκοπούς του πειράματος, 540 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 μιας ημέρας εμβολιασμένα κατά την εκκόλαψη, για Marek, λοιμώδη βρογχίτιδα και νόσο του Newcastle παραλήφθηκαν από ένα εμπορικό εκκολαπτήριο. Τα ορνίθια κατανεμήθηκαν σε 4 πειραματικές επεμβάσεις για 6 εβδομάδες. Κάθε επέμβαση είχε 9 επιδαπέδιους κλωβούς με 15 ορνίθια κρεοπαραγωγής το καθένα. Κάθε αντίγραφο τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό κλουβί δαπέδου (1 m²) και τα ορνίθια ανατράφηκαν σε απορρίμματα ριζοφλοιού. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας ρυθμίστηκε στους 32 °C την 1^η εβδομάδα και σταδιακά μειώθηκε στους 23 °C την 6^η εβδομάδα. Η θερμότητα παρέχεται με μια λάμπα θέρμανσης ανά κλουβί. Εκτός από την 1η ημέρα, εφαρμόστηκε ένα πρόγραμμα φωτισμού 18 ωρών φως προς 6 ωρών σκοτάδι κατά τη διάρκεια του πειράματος για να εξασφαλιστεί επαρκής πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Χρησιμοποιήθηκε παραγοντικός σχεδιασμός 2 × 2 με βασικούς παράγοντες τις προδιαγραφές σιτηρεσίου και την προσθήκη ΦΒΣ (ΦΒΣ1). Ακολουθήθηκε πρόγραμμα διατροφής τριών σταδίων με εναρκτήριο σιτηρέσιο (1 έως 10 ημέρες), σιτηρέσιο ανάπτυξης (11 έως 22 ημέρες) και σιτηρέσιο πάχυνσης (23 έως 42 ημέρες). Συγκεκριμένα, για κάθε φάση ανάπτυξης, διαμορφώθηκαν δύο τύποι σιτηρεσίου για να πληρούν το 95% και το 100% των βέλτιστων προδιαγραφών μεταβολιστέας

ενέργειας (ΜΕ) και πρωτεΐνης (ΟΠ) των Cobb 500, που δηλώνονται ως L και H, αντίστοιχα. Το ΦΒΣ1 που χρησιμοποιήθηκε περιείχε ένα μείγμα ενώσεων όπως καρβακρόλη, θυμόλη, καρβόνη, σαλικυλικό μεθυλεστέρα και μενθόλη (Digestaron® Biomin Phytogenics GmbH, Stadtoldendorf, Γερμανία). Τα σιτηρέσια ήταν σε μορφή αλέσματος, βασισμένα σε καλαμπόκι και σόγια και συμπληρώθηκαν με κοκκιδιοστάττικό. Σε όλο το πείραμα, η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα κατά βούληση.

Η υπολογιζόμενη χημική σύνθεση ανά kg των βασικών σιτηρεσίων (L έναντι H) ήταν η εξής. Για το αρχικό σιτηρέσιο: ΑΜΕη (11,97 έναντι 12,60) MJ, ακατέργαστη πρωτεΐνη (204,3 έναντι 215,0) g; λυσίνη (12,5 έναντι 13,2) g; μεθειονίνη + κυστεΐνη (9,4 έναντι 9,9) g; θρεονίνη (8,2 έναντι 8,6) g; ασβέστιο 9 g; διαθέσιμος φώσφορος 4,5 γρ. Για το σιτηρέσιο ανάπτυξης: ΑΜΕη (12,27 έναντι 12,92) MJ; ακατέργαστη πρωτεΐνη (185,3 έναντι 195) g; λυσίνη (11,3 έναντι 11,9) g; μεθειονίνη + κυστεΐνη (8,6 έναντι 9,0) g; θρεονίνη (7,5 έναντι 7,9) g; ασβέστιο 8,4 g; διαθέσιμος φώσφορος 4,2 γρ. Για το σιτηρέσιο πάχυνσης: ΑΜΕη (12,59 έναντι 13,26) MJ; ακατέργαστη πρωτεΐνη (175,8 έναντι 185,0) g; λυσίνη (10,0 έναντι 10,5) g; μεθειονίνη + κυστεΐνη (7,8 έναντι 8,2) g; θρεονίνη (6,8 έναντι 7,1) g; ασβέστιο 7,6 g; διαθέσιμος φώσφορος 3,8 γρ.

Ανάλογα με τον τύπο σιτηρεσίου (L και H) και τη προσθήκη ΦΒΣ1 (0 και 150 mg/kg σιτηρεσίου), οι τέσσερις πειραματικές επεμβάσεις ήταν: L⁻ (95% των βέλτιστων απαιτήσεων ΜΕ και ΟΠ χωρίς προσθήκη ΦΒΣ1), L⁺ (95% βέλτιστων απαιτήσεων ΜΕ και ΟΠ με προσθήκη ΦΒΣ1), H⁻ (100% των βέλτιστων απαιτήσεων ΜΕ και ΟΠ χωρίς προσθήκη ΦΒΣ1) και H⁺ (100% των βέλτιστων απαιτήσεων ΜΕ και ΟΠ με προσθήκη ΦΒΣ1).

Το πειραματικό πρωτόκολλο ήταν σύμφωνο με την ισχύουσα Οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (Ε.Κ. 43; Ε.Υ. 63) και εγκρίθηκε από την αρμόδια εθνική αρχή (Υπουργείο Γεωργίας και Κτηνιατρικής Πολιτικής, Γενική Διεύθυνση Γεωργίας, Οικονομίας, Κτηνιατρικής και Αλιείας). Τα ορνίθια υποβλήθηκαν σε ευθανασία με ηλεκτρική αναισθητοποίηση πριν από τη σφαγή.

4.2.2. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων όπως ο ρυθμός αύξησης σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), η κατανάλωση τροφής (ΚΤ) και ο συντελεστής εκμετάλλευσης τροφής (ΣΕΤ) αξιολογήθηκαν για ολόκληρη τη διάρκεια του πειράματος (42 ημέρες).

4.2.3. Δειγματοληψία ιστών

Στην ηλικία των 42 ημερών, επιλέχθηκαν τυχαία 9 ορνίθια κρεοπαραγωγής ανά επέμβαση και τα δείγματα δωδεκαδακτύλου, νήστιδας, ειλεού και τυφλών αφαιρέθηκαν προσεκτικά και καταψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80 °C για περαιτέρω αναλύσεις.

4.2.4. Μοριακές αναλύσεις (απομόνωση RNA, παρασκευή cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση πραγματικού χρόνου)

Το κεντρικό τμήμα του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας, του ειλεού και ολόκληρου του τυφλού ανοίχθηκαν και το περιεχόμενο αφαιρέθηκε. Στη συνέχεια, τα τμήματα χωρίς περιεχόμενο πλύθηκαν σε 30 mL κρύο ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικό αλατούχο (PBS)–αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA, 10 mmol/L) (pH = 7,2) και το επιθήλιο του βλεννογόνου αφαιρέθηκε με αντικειμενοφόρο πλάκα σε έναν αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf. Τελικά, το συνολικό RNA από τον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας, του ειλεού και του τυφλού λήφθηκε όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο του κατασκευαστή από την Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Γερμανία, με το χειρισμό του αντιδραστηρίου NucleoZOL. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA επιβεβαιώθηκαν με φασματοφωτομετρία με τη χρήση NanoDrop-1000 από την Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ηνωμένο Βασίλειο.

Η επεξεργασία με DNase έγινε προκειμένου να αφαιρεθεί το γονιδιωματικό DNA από τα δείγματα RNA. Δέκα μικρογραμμάρια RNA αραιώθηκαν με 1 U DNase I (M0303, New England Biolabs Inc, Ipswich, UK) και 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος DNase 10x σε τελικό όγκο 100 μL με την προσθήκη νερού DEPC, για 15-20 λεπτά στους 37 °C. Πριν από την απενεργοποίηση της DNase στους 75 °C για 10 λεπτά, το EDTA προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 mM για να προστατεύσει το RNA από την αποικοδόμηση κατά την απενεργοποίηση του ενζύμου. Η ακεραιότητα του RNA εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Από κάθε δείγμα, 500 ng ολικού RNA μεταγράφηκαν αντίστροφα σε cDNA από το κιτ αντιδραστηρίων PrimeScript RT (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Shiga-Ken,

Ιαπωνία) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Όλα τα cDNA αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια στους -20 °C.

Εξετάστηκαν τα ακόλουθα γονίδια *Gallus gallus*: μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (*Nrf2*), πρωτεΐνη Keap1 (*Keap1*), καταλάση (*CAT*), δισμουτάση του υπεροξειδίου 1 (*SOD1*), οξειδοαναγωγή ξανθίνης (*XOR*), υπεροξειδάση γλουταθειόνης 2, 7 (*GPX2*, *GPX7*), οξυγενάση της αίμης 1 (*HMOX1*), *NAD(P)H* αφυδρογονάση της κινόνης 1 (*NQO1*), γλουταθειόνη S-τρανσφεράση άλφα 2 (*GSTA2*), αναγωγή γλουταθειόνης-δισουλφιδίου (*GSR*), υπεροξειρεδοξίνη-1 (*PRDX1*), θειορεδοξίνη (*TXN*), 3-φωσφορική αφυδρογονάση γλυκεραλδεϋδης (*GAPDH*) και ακτίνη βήτα (*ACTB*). Οι κατάλληλοι εκκινητές, ειδικά για cDNA, σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες του GenBank που κατατέθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας και στην Εθνική Βιβλιοθήκη Ιατρικής των ΗΠΑ (NCBI) που φαίνονται στον **Πίνακα 4.1**. Οι εκκινητές ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο PRIMER BLAST για βάσεις δεδομένων mRNA *Gallus gallus* για να διασφαλιστεί ότι υπήρχε ένα μοναδικό αμπλικόνιο.

Πίνακας 4.1. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων στόχων με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR-cDNA (bp)	Αριθμός GenBank πρόσβασης
<i>GAPDH</i>	F: ACTTTGGCATTGTGGAGGGT R: GGACGCTGGGATGATGTTCT	59.5	131	NM_204305.1
<i>ACTB</i>	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAGTGGTACG	60	101	NM_205518.1
<i>Nrf2</i>	F: AGACGCTTTCTTCAGGGGTAG R: AAAAACTTCACGCCTTGCCC	60	285	NM_205117.1
<i>Keap1</i>	F: GGTTACGATGGGACGGATCA R: CACGTAGATCTTGCCCTGGT	62	135	XM_025145847.1
<i>CAT</i>	F: ACCAAGTACTGCAAGGCGAA R: TGAGGGTTCCTCTTCTGGCT	60	245	NM_001031215
<i>SOD1</i>	F: AGGGGGTCATCCACTTCC R: CCCATTTGTGTTGTCTCCAA	60	122	NM_205064.1
<i>XOR</i>	F: GTGTCGGTGTACAGGATACAGAC R: CCTTACTATGACAGCATCCAGTG	61	110	NM_205127.1
<i>GPX2</i>	F: GAGCCCAACTTCACCCTGTT R: CTTCAGGTAGGCGAAGACGG	62	75	NM_001277854.1
<i>GPX7</i>	F: GGCTCGGTGTCGTTAGTTGT R: GCCCAAAGTATTGCATGGG	60	139	NM_001163245.1
<i>HMOX1</i>	F: ACACCCGCTATTTGGGAGAC R: GAACTTGGTGGCGTTGGAGA	62	134	NM_205344.1
<i>NQO1</i>	F: GAGCGAAGTTCAGCCCAGT R: ATGGCGTGGTTGAAAGAGGT	60.5	150	NM_001277619.1
<i>GST</i>	F: GCCTGACTTCAGTCCTTGGT	60	138	NM_001001776.1

<i>GSR</i>	R: CCACCGAATTGACTCCATCT F: GTGGATCCCCACAACCATGT	62	80	XM_015276627.1
<i>PRDX1</i>	R: CAGACATCACCGATGGCGTA F: CTGCTGGAGTGCGGATTGT	61	105	NM_001271932.1
<i>TXN</i>	R: GCTGTGGCAGTAAAATCAGGG F: ACGGAAAGAAGGTGCAGGAAT R: GATCCAGACATGCTCCGATGT	60	110	NM_205453.1

F— Πρόσθιος εκκινητής; R— ανάστροφος εκκινητής

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε μικροπλάκες 96 πηγαδιών με SaCycler-96 Real-Time PCR (Sacace Biotechnologies s.r.l., Como, Ιταλία) και FastGene IC Green 2x qPCR universal mix (Nippon Genetics, Τόκιο, Ιαπωνία). Κάθε αντίδραση περιελάμβανε 12,5 ng ισοδύναμα RNA μαζί με 200 nmol/L πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών για κάθε γονίδιο. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 95 °C για 3 λεπτά, συνοδευόμενες από 40 κύκλους στους 95 °C για 5 δευτερόλεπτα, 59,5 έως 62 °C (ανάλογα με το γονίδιο στόχο) για 20 δευτερόλεπτα, 72 °C για 33 δευτερόλεπτα. Αυτό ακολούθησε μια ανάλυση καμπύλης τήξης για να ελεγχθεί η ειδικότητα της αντίδρασης. Κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις διπλούν. Οι σχετικοί λόγοι έκφρασης των γονιδίων-στόχων υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον Pfaffl, 2001 προσαρμοσμένο για τη διαδικασία κανονικοποίησης γονιδίων πολλαπλών αναφορών σύμφωνα με τον Hellemans et al., 2007 χρησιμοποιώντας το GAPDH και την ACTB ως γονίδια αναφοράς.

4.2.5. Βιοχημικές αναλύσεις

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (OAI) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία απορρόφησης ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ORAC; Cao and Prior, 1999) για την αξιολόγηση των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών (Prior et al., 2003). Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αραιωμένα δείγματα βλεννογόνου από δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα, ειλέο και τυφλό έντερο σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS) και η ικανότητα καθυστέρησης της αποσύνθεσης του φθορισμού της φουκοερυθρίνης υπό την παρουσία 2,2'-αζωδισ (2-μεθυλοραμίδιο (2-μεθυλοραμίδιο) (APPH) που χρησιμοποιήθηκε ως οξειδωτικό και συγκρίθηκε με αυτό του trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8 τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) που χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό πρότυπο. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως συγκέντρωση των ισοδυνάμων trolox (TE) (mmol/L βλενογόνου).

4.2.6. Στατιστική ανάλυση

Τα πειραματικά δεδομένα δοκιμάστηκαν για κανονικότητα χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Kolmogorov–Smirnov και βρέθηκε ότι κατανέμονται κανονικά. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη διαδικασία γενικού γραμμικού μοντέλου (GLM) – γενικής παραγοντικής ANOVA χρησιμοποιώντας τύπο σιτηρεσίου (L, H) και προσθήκη ΦΒΣ1 (- και +) ως σταθερούς παράγοντες. Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα αναλύθηκαν περαιτέρω και οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας τη διαδικασία πολλαπλής σύγκρισης στατιστικά σημαντικής διαφοράς του Tukey. Η στατιστική

σημασία προσδιορίστηκε σε $p \leq 0,05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS για Windows Statistical Package Program (SPSS 17.0, Inc., Chicago, IL, USA).

4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Βρέθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και του ΦΒΣ1 για το ΡΑΣΒ ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.001$) και το ΣΕΤ ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.024$). Ειδικότερα, τα ορνίθια κρεοπαραγωγής των επεμβάσεων Η- και Η+ είχαν υψηλότερες τιμές ΡΑΣΒ και χαμηλότερες τιμές ΣΕΤ σε σύγκριση με τις επεμβάσεις L- και L+, ενώ τα ορνίθια κρεοπαραγωγής της επέμβασης L+ είχαν καλύτερες ΡΑΣΒ και ΣΕΤ σε σύγκριση με την επέμβαση L-. Επιπλέον, τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου Η παρουσίασαν υψηλότερο ($P_{\Delta} < 0.001$) ΡΑΣΒ, ΚΤ ($P_{\Delta} = 0.046$) και χαμηλότερο ΣΕΤ ($P_{\Delta} < 0.001$) σε σύγκριση με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου L. Επιπλέον, η συμπερίληψη ΦΒΣ1 αύξησε σημαντικά το ΡΑΣΒ ($P_{\Phi} = 0.002$) και βελτίωσε τον ΣΕΤ ($P_{\Phi} = 0.043$) για ολόκληρο το πείραμα (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2. Συνολικά παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων.

	Ολικός ΡΑΣΒ (g)	Ολική ΚΤ (g)	Ολικός ΣΕΤ (g ΚΤ/g ΡΑΣΒ)
Τύπος σιτηρεσίου¹			
L	2411.7 ^A	4114.9 ^A	1.71 ^B
H	2692.1 ^B	4194.3 ^B	1.56 ^A
Προσθήκη ΦΒΣ1²			
-	2523.1 ^X	4138.2	1.65 ^Y
+	2580.7 ^Y	4171.1	1.62 ^X
Επεμβάσεις			
L-	2353.3 ^a	4086.3	1.74 ^c
L+	2470.1 ^b	4143.6	1.68 ^b
H-	2692.8 ^c	4190.1	1.56 ^a
H+	2691.3 ^c	4198.6	1.56 ^a
SEM ⁴	16.78	38.20	0.013
P _Δ ³	<0.001	0.046	<0.001
P _Φ ³	0.002	0.395	0.043
P _{Δ×Φ} ³	0.001	0.528	0.024

¹ Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και Η (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ).

² Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου).

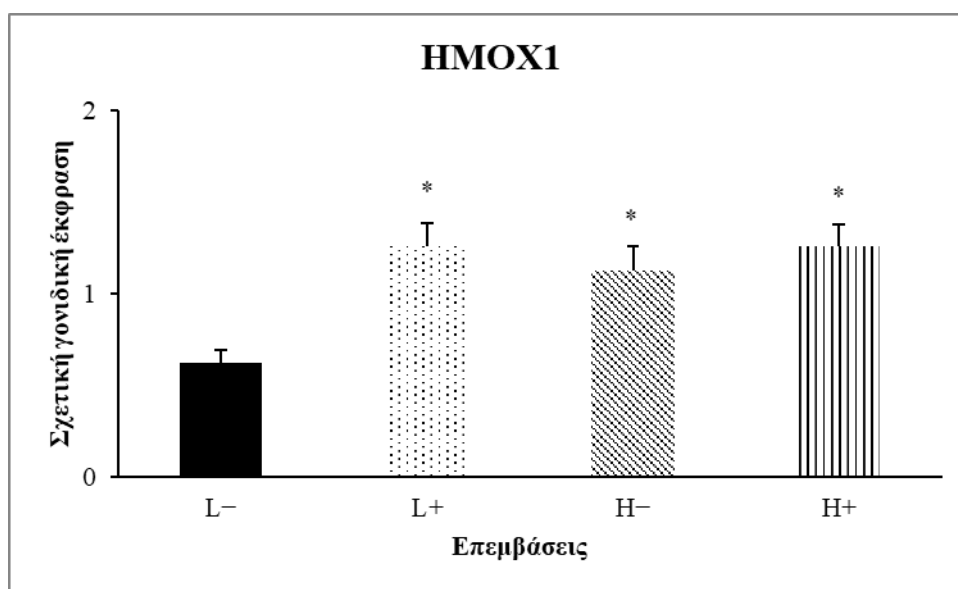
³ Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B), για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X,Y) και για τους μέσους των αλληλεπιδράσεων τους (a, b, c).

⁴Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.2. Έκφραση γονιδίων σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα

4.3.2.1. Δωδεκαδάκτυλος

Στο βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου, παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.017$) (Σχήμα 14) μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *HMOX1*, με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής (L-) να έχουν χαμηλότερη σχετική γονιδιακή έκφραση σε σύγκριση με τις άλλες επεμβάσεις.



Σχήμα 14. Αλληλεπίδρασεις διατροφής και ΦΒΣ1 στη σχετική γονιδιακή έκφραση του *HMOX1* στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου ορνιθίων 42 ημερών. Οι στήλες υποδεικνύουν το μέσο όρο των επεμβάσεων + τυπική απόκλιση και οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστική διαφορά ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.017$).

Επιπλέον, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.3, ο τύπος σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά ($P < 0.05$) τη σχετική γονιδιακή έκφραση των *GPX2* ($P_{\Delta} = 0.043$) και *HMOX1* ($P_{\Delta} = 0.017$) με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου L να παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση σε σύγκριση με τα ορνίθια με σιτηρέσιο τύπου H. Επίσης, ο τύπος σιτηρεσίου επηρέασε τη σχετική γονιδιακή έκφραση του *TXN* ($P_{\Delta} = 0.017$) με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονται με σιτηρέσιο τύπου H να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τα ορνίθια

κρεοπαραγωγής που τρέφονται με σιτηρέσιο τύπου L. Επιπλέον, η προσθήκη ΦΒΣ1 αυξάνει σημαντικά ($P < 0.05$) τα σχετικά επίπεδα έκφρασης *Keap1* ($P_{\Phi} = 0.001$), *CAT* ($P_{\Phi} = 0.035$), *SOD1* ($P_{\Phi} = 0.019$), *HMOX1* ($P_{\Phi} = 0.001$), *NQO1* ($P_{\Phi} = 0.001$), *GSR* ($P_{\Phi} = 0.041$), *PRDX1* ($P_{\Phi} = 0.019$) και *TXN* ($P_{\Phi} = 0.035$). Η γονιδιακή έκφραση των *Nrf2*, *XOR*, *GPX7* και *GST* δεν επηρεάστηκε σημαντικά ($P > 0.05$) από την προσθήκη ΦΒΣ1 ή τον τύπο σιτηρεσίου.

Πίνακας 4.3. Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στο βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου ορνιθίων 42 ημερών.

Δεδομένα	Τύπος σιτηρεσίου ²		Προσθήκη ΦΒΣ1 ³		SEM ⁵	p-Values ⁴		
	L	H	-	+		Δ	Φ	Δ×Φ
Δωδεκαδάκτυλος								
Γονίδια¹								
<i>Nrf2</i>	1.01	1.29	1.17	1.13	0.222	0.224	0.836	0.794
<i>KEAP1</i>	1.08	1.05	0.89 ^X	1.25 ^Y	0.096	0.753	0.001	0.125
<i>CAT</i>	2.22	2.15	1.78 ^X	2.59 ^Y	0.366	0.842	0.035	0.491
<i>SOD1</i>	1.02	1.14	0.92 ^X	1.24 ^Y	0.131	0.385	0.019	0.063
<i>XOR</i>	1.16	1.04	0.97	1.23	0.184	0.513	0.171	0.475
<i>GPX2</i>	1.69 ^B	1.03 ^A	1.06	1.66	0.313	0.043	0.063	0.170
<i>GPX7</i>	1.33	1.23	1.49	1.07	0.367	0.791	0.262	0.862
<i>HMOX1</i>	0.94 ^A	1.19 ^B	0.87 ^X	1.26 ^Y	0.101	0.017	0.001	0.017
<i>NQO1</i>	1.11	1.01	0.86 ^X	1.25 ^Y	0.109	0.368	0.001	0.183
<i>GST</i>	1.48	1.15	1.03	1.60	0.327	0.271	0.071	0.934
<i>GSR</i>	1.10	1.18	0.93 ^X	1.34 ^Y	0.194	0.664	0.041	0.062
<i>PRDX1</i>	1.77	1.62	1.38 ^X	2.00 ^Y	0.249	0.557	0.019	0.794
<i>TXN</i>	0.92 ^B	1.26 ^A	0.94 ^X	1.24 ^Y	0.136	0.019	0.035	0.120

¹Οι σχετικοί λόγοι έκφρασης των γονιδίων-στόχων υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον Pfaffl, 2001 προσαρμοσμένο για τη διαδικασία κανονικοποίησης γονιδίων πολλαπλών αναφορών σύμφωνα με τον Hellemans et al., 2007 χρησιμοποιώντας το *GAPDH* και την *ACTB* ως γονίδια αναφοράς.

²Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

³Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

⁴ Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

⁵ Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.2.2. *Νήστιδα*

Στο βλεννογόνο της νήστιδας, ο τύπος διατροφής επηρέασε σημαντικά τα *GPX2* ($P_{\Delta} = 0.005$) και *PRDX1* ($P_{\Delta} = 0.002$), με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου L να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τα ορνίθια που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου H, όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 4.4**. Παράλληλα, η σχετική γονιδιακή έκφραση των *Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD1*, *XOR*, *GPX7*, *HMOX1*, *NQO1*, *GST*, *GSR* και *TXN* δεν επηρεάστηκε σημαντικά ($P > 0.05$) ούτε από τον τύπο διατροφής ούτε από την προσθήκη ΦΒΣ1.

Πίνακας 4.4. Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στο βλεννογόνο της νήστιδας ορνιθίων 42 ημερών.

Δεδομένα Νήστιδα	Τύπος σιτηρεσίου ²		Προσθήκη ΦΒΣ1 ³		SEM ⁵	Δ	p-Values ⁴	
	L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
Γονίδια¹								
<i>Nrf2</i>	1.28	1.20	1.26	1.22	0.330	0.849	0.829	0.743
<i>Keap1</i>	1.09	1.07	1.07	1.09	0.109	0.926	0.886	0.430
<i>CAT</i>	1.17	1.00	1.08	1.09	0.126	0.180	0.951	0.719
<i>SOD1</i>	1.10	1.06	1.03	1.13	0.137	0.734	0.480	0.066
<i>XOR</i>	1.15	1.05	1.08	1.12	0.158	0.492	0.831	0.953
<i>GPX2</i>	1.46 ^B	0.87 ^A	1.00	1.33	0.138	0.005	0.108	0.294
<i>GPX7</i>	1.13	1.10	1.12	1.11	0.175	0.850	0.960	0.930
<i>HMOX1</i>	0.96	1.22	1.01	1.16	0.095	0.064	0.285	0.375
<i>NQO1</i>	1.04	1.08	1.09	1.03	0.088	0.766	0.628	0.793
<i>GST</i>	0.91	1.34	1.00	1.24	0.148	0.050	0.260	0.245
<i>GSR</i>	0.95	1.12	1.05	1.01	0.110	0.130	0.749	0.206
<i>PRDX1</i>	2.39 ^B	1.63 ^A	1.99	2.01	0.225	0.002	0.908	0.654
<i>TXN</i>	1.06	1.09	1.11	1.04	0.136	0.818	0.637	0.824

¹Οι σχετικοί λόγοι έκφρασης των γονιδίων-στόχων υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον Pfaffl, 2001 προσαρμοσμένο για τη διαδικασία κανονικοποίησης γονιδίων πολλαπλών αναφορών σύμφωνα με τον Hellemans et al., 2007 χρησιμοποιώντας το *GAPDH* και την *ACTB* ως γονίδια αναφοράς.

²Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

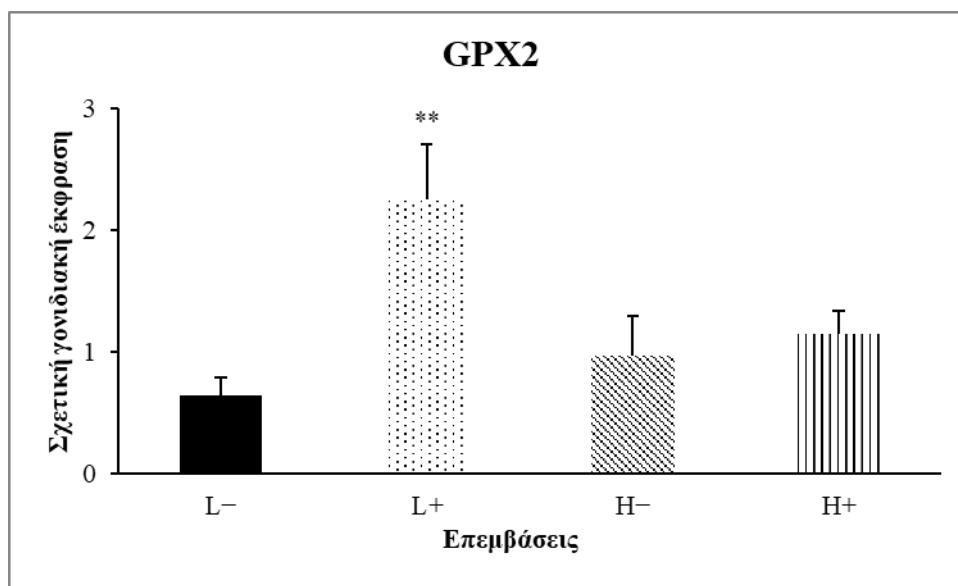
³Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

⁴Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B).

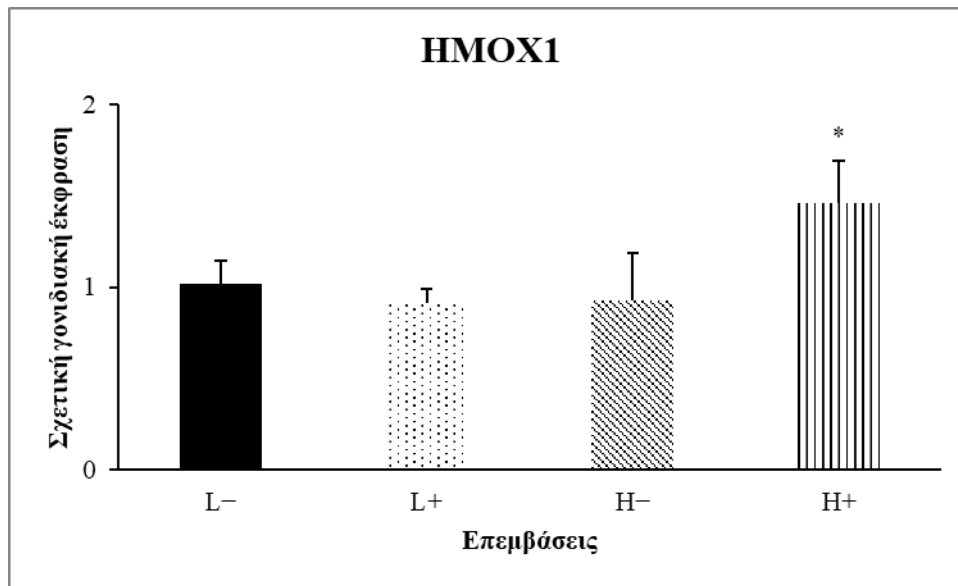
⁵Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.2.3. Ειλεός

Στο βλεννογόνο του ειλεού, σημειώθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 για το *GPX2* ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.007$) και το *HMOX1* ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.024$) όπως φαίνεται στα σχήματα 12 και 13. Ειδικότερα, το υψηλότερο σχετικό επίπεδο έκφρασης για την *GPX2* βρέθηκε στην επέμβαση L+, ενώ για την *HMOX1*, η επέμβαση H+ είχε το υψηλότερο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης σε σύγκριση με τις άλλες επεμβάσεις.



Σχήμα 15. Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στη σχετική γονιδιακή έκφραση του *GPX2* στο βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων 42 ημερών. Οι στήλες υποδεικνύουν το μέσο όρο των επεμβάσεων + τυπική απόκλιση και ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική διαφορά ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.007$).



Σχήμα 16. Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στη σχετική γονιδιακή έκφραση του *HMOX1* στο βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων 42 ημερών. Οι στήλες υποδεικνύουν το μέσο όρο των επεμβάσεων + τυπική απόκλιση και ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική διαφορά ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.024$).

Επιπλέον, ο τύπος σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά ($P_{\Delta} = 0.006$) την έκφραση της *CAT*, με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου L να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονται με σιτηρέσιο τύπου H. Επίσης, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.5**, η προσθήκη ΦΒΣ1 αυξάνει σημαντικά ($P_{\Phi} < 0.001$) τη σχετική γονιδιακή έκφραση του *GPX2*. Τέλος, η σχετική γονιδιακή έκφραση των *Nrf2*, *Keap1*, *SOD1*, *XOR*, *GPX7*, *NQO1*, *GST*, *GSR*, *PRDX1* και *TXN* δεν επηρεάστηκε σημαντικά ($P > 0.05$) ούτε από τον τύπο σιτηρεσίου ούτε από την προσθήκη ΦΒΣ1.

Πίνακας 4.5. Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στον βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων 42 ημερών.

Δεδομένα	Τύπος σιτηρεσίου ²		Προσθήκη ΦΒΣ1 ³		SEM ⁵	p-Values ⁴		
	L	H	-	+		Δ	Φ	Δ×Φ
Ειλεός Γονίδια¹								
<i>Nrf2</i>	1.33	1.05	1.35	1.03	0.226	0.220	0.166	0.114
<i>Keap1</i>	1.11	1.03	1.02	1.12	0.126	0.553	0.438	0.433
<i>CAT</i>	1.26 ^B	0.91 ^A	1.00	1.17	0.120	0.006	0.149	0.151
<i>SOD1</i>	1.11	1.00	1.06	1.05	0.113	0.336	0.903	0.981
<i>XOR</i>	1.05	1.08	1.04	1.08	0.128	0.836	0.757	0.724
<i>GPX2</i>	1.45	1.06	0.81 ^X	1.70 ^Y	0.251	0.657	<0.001	0.007
<i>GPX7</i>	1.10	1.21	1.23	1.08	0.224	0.633	0.507	0.779
<i>HMOX1</i>	0.96	1.20	0.97	1.19	0.134	0.096	0.115	0.024
<i>NQO1</i>	1.18	0.95	1.05	1.08	0.119	0.058	0.845	0.184
<i>GST</i>	1.08	1.42	0.98	1.51	0.347	0.477	0.629	0.333
<i>GSR</i>	1.22	0.94	1.01	1.15	0.153	0.078	0.375	0.994
<i>PRDX1</i>	1.65	2.06	1.57	2.14	0.289	0.163	0.060	0.125
<i>TXN</i>	1.03	1.13	1.08	1.08	0.155	0.528	0.994	0.599

¹Οι σχετικοί λόγοι έκφρασης των γονιδίων-στόχων υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον Pfaffl, 2001 προσαρμοσμένο για τη διαδικασία κανονικοποίησης γονιδίων πολλαπλών αναφορών σύμφωνα με τον Hellemans et al., 2007 χρησιμοποιώντας το *GAPDH* και την *ACTB* ως γονίδια αναφοράς.

²Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

³Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

⁴ Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

⁵ Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.2.4. Τυφλά

Στο βλεννογόνο των τυφλών, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.6**, ο τύπος σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά ($P < 0.05$) τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *Keap1* ($P_{\Delta} = 0.014$), *GPX2* ($P_{\Delta} = 0.003$), *GPX7* ($P_{\Delta} = 0.032$) και *PRDX1* ($P_{\Delta} = 0.006$), με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονται με σιτηρέσιο τύπου L να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τα ορνίθια που τρέφονται με σιτηρέσιο τύπου H. Επιπλέον, η προσθήκη ΦΒΣ1 αυξάνει σημαντικά ($P_{\Phi} = 0.041$) το σχετικό επίπεδο γονιδιακής έκφρασης της *GST*. Ωστόσο, η σχετική γονιδιακή έκφραση των *Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD1*, *XOR*, *HMOX1*, *NQO1*, *GSR* και *TXN* δεν επηρεάστηκε σημαντικά ($P > 0.05$) ούτε από τον τύπο σιτηρεσίου ούτε από την προσθήκη ΦΒΣ1.

Πίνακας 4.6. Σχετική έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Nrf2/ARE στον βλεννογόνο των τυφλών σε ορνίθια 42 ημερών.

Δεδομένα Τυφλά Γονίδια ¹	Τύπος σιτηρεσίου ²		Προσθήκη ΦΒΣ1 ³		SEM ⁵	p-Values ⁴		
	L	H	-	+		Δ	Φ	Δ×Φ
<i>Nrf2</i>	1.16	1.14	1.18	1.13	0.204	0.910	0.787	0.718
<i>Keap1</i>	1.31 ^B	0.93 ^A	1.01	1.24	0.147	0.014	0.133	0.077
<i>CAT</i>	1.05	1.24	0.91	1.38	0.255	0.454	0.077	0.202
<i>SOD1</i>	1.13	1.11	1.04	1.20	0.172	0.926	0.352	0.135
<i>XOR</i>	1.21	1.07	1.00	1.28	0.262	0.402	0.393	0.359
<i>GPX2</i>	1.40 ^B	0.86 ^A	1.02	1.24	0.166	0.003	0.198	0.102
<i>GPX7</i>	1.39 ^B	0.94 ^A	1.08	1.25	0.201	0.032	0.406	0.144
<i>HMOX1</i>	1.22	1.04	1.12	1.15	0.152	0.247	0.865	0.991
<i>NQO1</i>	1.11	1.09	1.17	1.03	0.148	0.911	0.359	0.454
<i>GST</i>	1.34	0.99	0.98 ^X	1.35 ^Y	0.175	0.058	0.041	0.461
<i>GSR</i>	1.10	1.23	1.24	1.10	0.207	0.522	0.505	0.191
<i>PRDX1</i>	1.94 ^B	1.29 ^A	1.44	1.79	0.221	0.006	0.127	0.962
<i>TXN</i>	1.21	1.05	0.99	1.27	0.199	0.445	0.167	0.560

¹ Οι σχετικοί λόγοι έκφρασης των γονιδίων-στόχων υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον Pfaffl, 2001 προσαρμοσμένο για τη διαδικασία κανονικοποίησης γονιδίων πολλαπλών αναφορών σύμφωνα με τον Hellemans et al., 2007 χρησιμοποιώντας το *GAPDH* και την *ACTB* ως γονίδια αναφοράς.

² Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

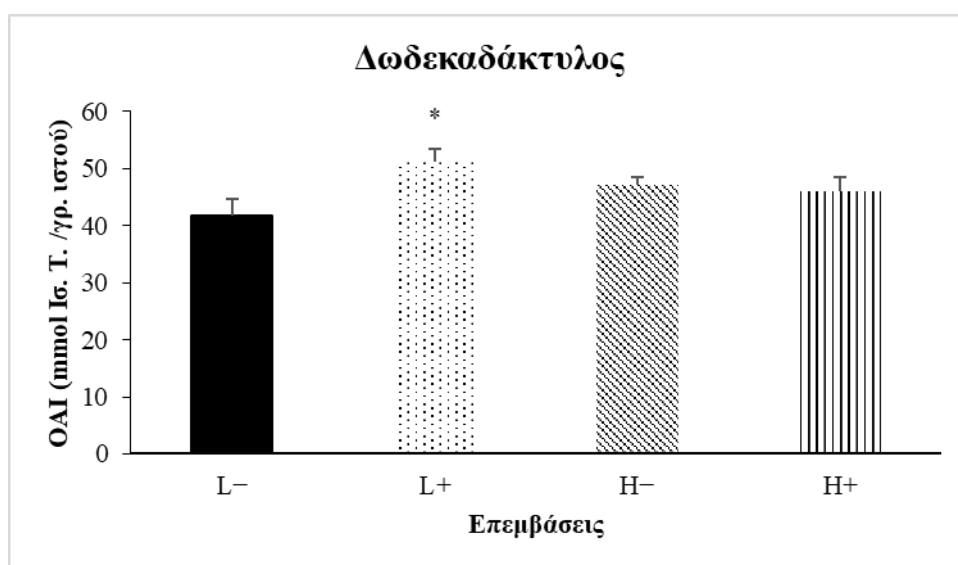
³ Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

⁴ Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

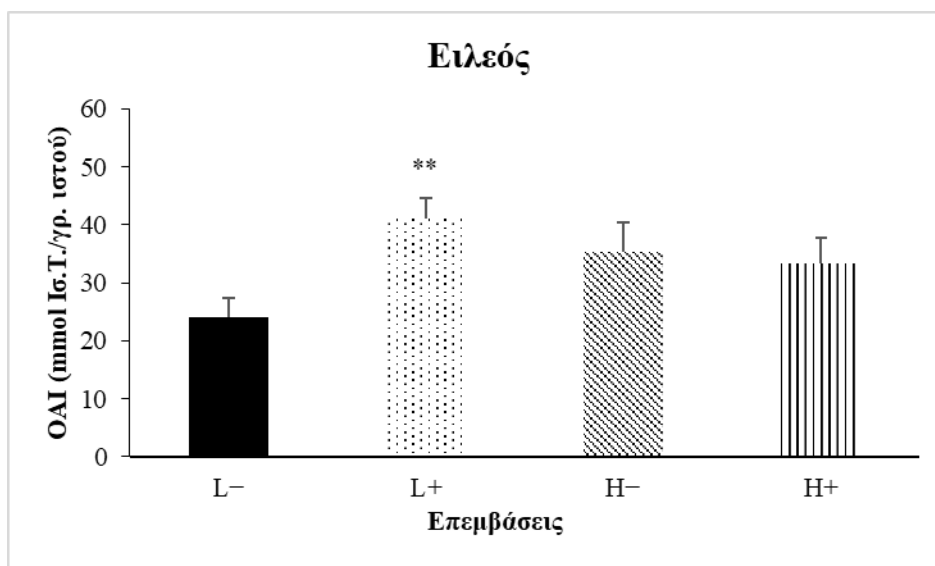
5 Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (ΟΑΙ) σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα

Σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 για ΟΑΙ σημειώθηκαν στο βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.024$) και του ειλεού ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.007$) όπως φαίνεται στα Σχήματα 17 και 18, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η επέμβαση L+ είχε υψηλότερη ΟΑΙ σε σύγκριση με τις άλλες επεμβάσεις. Επιπλέον, ο τύπος σιτηρεσίου επηρέασε σημαντικά την ΟΑΙ στον βλεννογόνο της νήστιδας ($P_{\Delta} = 0.001$) με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονταν με σιτηρέσιο τύπου Η να έχουν υψηλότερη ΟΑΙ σε σύγκριση με τα ορνίθια που τρέφονται με σιτηρέσιο τύπου L.



Σχήμα 17. Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (ΟΑΙ) του βλεννογόνου στο δωδεκαδάκτυλο σε ορνίθια κρεοπαραγωγής 42 ημερών. Οι στήλες υποδεικνύουν το μέσο όρο των επεμβάσεων + τυπική απόκλιση και ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική διαφορά ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.024$).



Σχήμα 18. Αλληλεπιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και προσθήκης ΦΒΣ1 στη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (OAI) στο βλεννογόνο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών. Οι στήλες υποδεικνύουν το μέσο όρο επεμβάσεων + τυπική απόκλιση και ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική διαφορά ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.007$).

Τέλος, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.7, η προσθήκη ΦΒΣ1 αύξησε σημαντικά την OAI στο βλεννογόνο της νήστιδας ($P_{\Phi} < 0.001$), του ειλεού ($P_{\Phi} = 0.033$) και των τυφλών ($P_{\Phi} = 0.032$).

Πίνακας 4.7. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (ΟΑΙ) κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

ΟΑΙ ¹ (mmol TE/g ιστού)	Τύπος σιτηρεσίου ²		Προσθήκη ΦΒΣ1 ³		SEM ⁴	p-Values ⁵		
Δεδομένα	L	H	-	+		Δ	Φ	Δ×Φ
Δωδεκαδάκτυλος	46.46	46.53	44.38	48.60	2.279	0.976	0.073	0.024
Νήστιδα	39.22 ^A	52.38 ^B	38.32 ^X	53.29 ^Y	3.748	0.001	<0.001	0.250
Ειλεός	32.53	34.31	29.73 ^X	37.11 ^Y	3.316	0.594	0.033	0.007
Τυφλά	33.94	39.03	32.49 ^X	40.48 ^Y	3.564	0.163	0.032	0.300

TE = ισοδύναμα trolox.

¹Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεξεργασίας από n = 9 αντίγραφα στυλό δαπέδου ανά επεξεργασία (L, L+, H, H+).

²Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

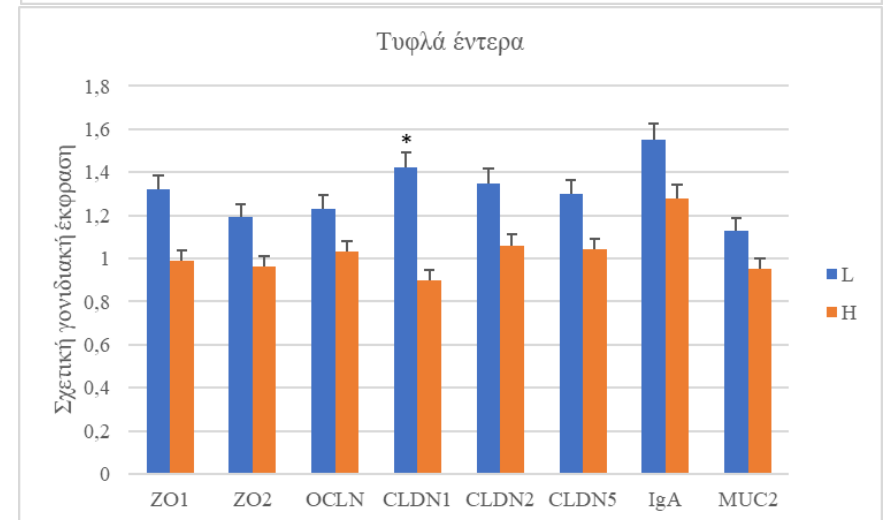
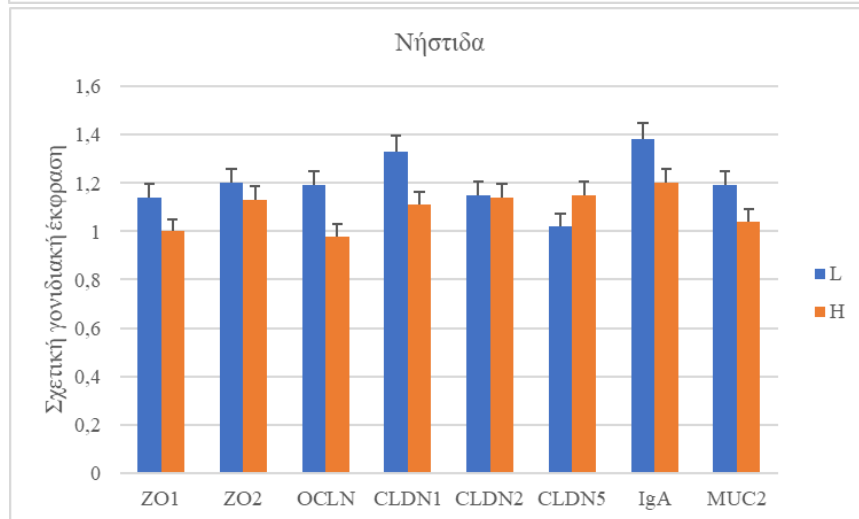
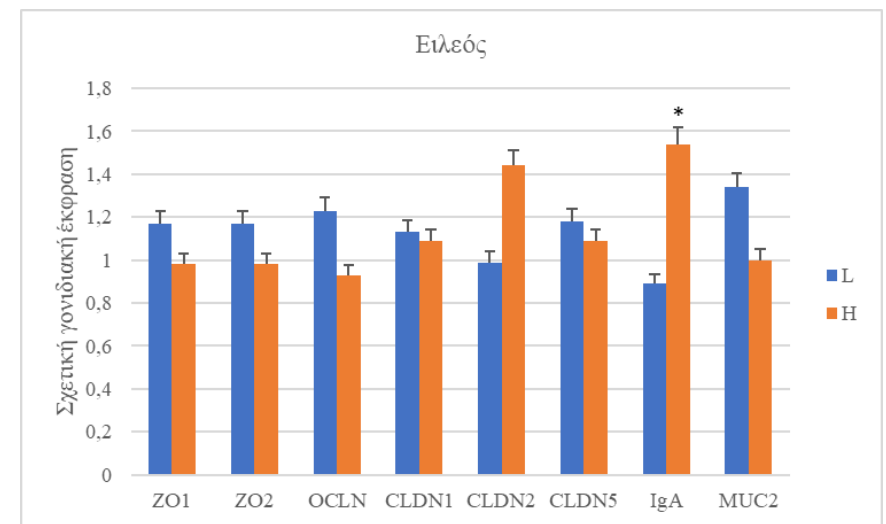
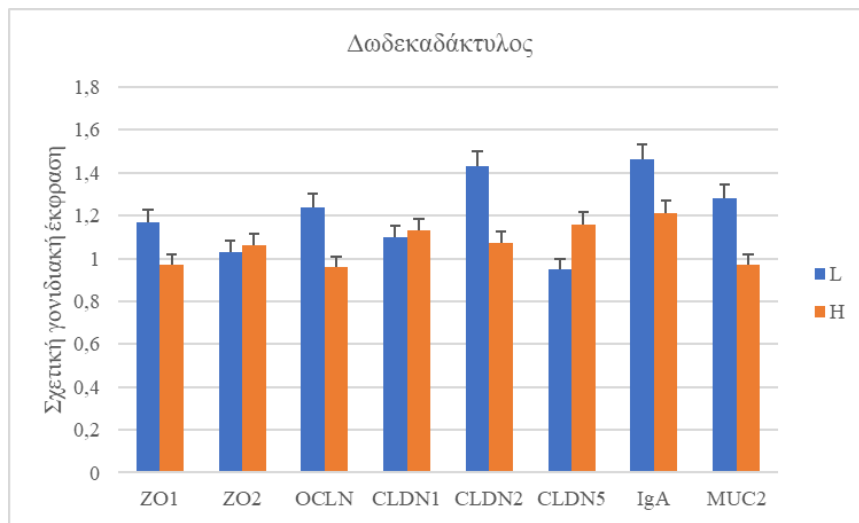
³Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

⁴ Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

⁵ Τυπικό σφάλμα μέσων.

4.3.4. Σχετική γονιδιακή έκφραση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό κατά μήκος του εντέρου

Παρακάτω θα παρουσιαστούν διαγραμματικά οι επιδράσεις της διατροφής και της προσθήκης του ΦΒΣ1 στα γονίδια που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό (τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι δημοσιευμένα όπως τα παραπάνω παρόλα αυτά συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα ΔΔ καθώς αποτελούν τμήμα αυτής). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα γονίδια που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό στον δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα. Στον ειλεό παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στην IgA ($P_{\Delta}=0.030$) κατά την επέμβαση Η. Παράλληλα διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($P_{\Delta}=0.042$) του CLDN1 στα τυφλά έντερα στην επέμβαση Η ενώ παρατηρήθηκε και στατιστικώς σημαντική αύξηση ($P_{\Phi}=0.020$) της IgA με την προσθήκη του ΦΒΣ1 στα τυφλά έντερα.



Σχήμα 19. Σχετική γονιδιακή έκφραση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό κατά μήκος του εντέρου με την επίδραση της διατροφής.



Σχήμα 20. Σχετική γονιδιακή έκφραση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό κατά μήκος του εντέρου με την προσθήκη ΦΒΣ1.

4.4. Συζήτηση-Σχολιασμός

Οι επιδράσεις της μειωμένης ενέργειας και πρωτεΐνης στην εντερική υγεία και λειτουργία των ορνιθίων παραμένει ανεξερεύνητη τα τελευταία χρόνια ειδικά με την προσθήκη κάποιου πρόσθετου που μπορεί να αντιστρέψει τις αρνητικές συνέπειες των επιδράσεων αυτών. Στην 1^η μελέτη της παρούσας ΔΔ, ο συνολικός ΡΑΣΒ και ο ΣΕΤ ήταν βελτιωμένοι στα ορνίθια που έλαβαν σιτηρέσιο τύπου Η σε σύγκριση με το σιτηρέσιο τύπου L. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις της μειωμένης ενέργειας και πρωτεΐνης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων (Bravo et al., 2014; Yang et al., 2015; Paraskeuas et al., 2016; Taleb et al., 2017). Ωστόσο, η μειωμένη ενέργεια και πρωτεΐνη στα σιτηρέσια των ορνιθίων δεν έχει μελετηθεί ακόμα για τις μεταβολικές οδούς που σχετίζονται με την κυτταροπροστασία μέσω του μονοπατιού Nrf2/ARE. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις για επιδράσεις της μείωσης της διατροφικής ενέργειας και πρωτεΐνης στο μονοπάτι Nrf2/ARE στους ανθρώπους (Delles et al., 2014; Lee et al., 2016).

Οι φυτογενείς ενώσεις πέρα από τα οφέλη τους για τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και την αντιοξειδωτική ικανότητα του κρέατος στα ορνίθια κρεοπαραγωγής (Mountzouris et al., 2011; Bravo et al., 2014; Paraskeuas et al., 2016; Hafeez et al., 2016) κερδίζουν την προσοχή και για τον λειτουργικό τους ρόλο σε κρίσιμα στοιχεία της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού και της φλεγμονής (Du et al., 2016; Paraskeuas and Mountzouris, 2019b). Όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, ο ΡΑΣΒ και ο ΣΕΤ βελτιώθηκαν σε ορνίθια που έλαβαν ΦΒΣ1, ειδικά στην περίπτωση του σιτηρεσίου L, ενώ τα ορνίθια της επέμβασης L+ ήταν καλύτερα σε σύγκριση με την επέμβαση L-. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στο παρελθόν (Mountzouris et al., 2011; Bravo et al., 2014; Paraskeuas et al., 2016).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι διάφορα ΦΒΣ μπορούν να τροποποιήσουν ευεργετικά το μονοπάτι Nrf2/ARE στο έντερο των ορνιθίων (Paraskeuas and Mountzouris, 2019b; Mountzouris et al., 2020), ενώ για τα επίπεδα διατροφικής ενέργειας και πρωτεΐνης σε συνδυασμό με ΦΒΣ οι μελέτες είναι ελάχιστες. Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη είχε στόχο να δημιουργήσει νέα γνώση σχετικά με τις επιδράσεις των επιπέδων διατροφικής ενέργειας και πρωτεΐνης σε συνδυασμό ή όχι με προσθήκη ΦΒΣ1 στην πιθανή διέγερση

αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών ενζύμων, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Nrf2/ARE.

Σε αυτή τη μελέτη, η συνολική πρόσληψη τροφής δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των πειραματικών επεμβάσεων. Επομένως, σύμφωνα με τις προδιαγραφές διατροφής, τα ορνίθια με σιτηρέσιο χαμηλών προδιαγραφών (δηλαδή επεμβάσεις L και L+) είχαν πράγματι χαμηλότερη συνολική πρόσληψη μεταβολιστέας ενέργειας και πρωτεΐνης κατά περίπου 5%, σε σύγκριση με τα ορνίθια με υψηλές διατροφικές προδιαγραφές (δηλαδή, επεμβάσεις H και H+).

Οι αλληλεπιδράσεις για τα γονίδια *HMOX1* και *GPX2* μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 έδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Όταν μόνο μερικά γονίδια εμφανίζουν διαφορές, αυτές οι διαφορές από μόνες τους μπορεί να είναι αμφισβητήσιμες αλλά θα μπορούσε να ληφθούν υπόψη μαζί με τα αποτελέσματα για την ΟΑΙ στον ειλέο που υποδεικνύουν το ρόλο του ΦΒΣ1 στη βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ακόμα και στην περίπτωση της μειωμένης ενέργειας και πρωτεΐνης. Όσον αφορά την εξάρτηση του τμήματος του εντέρου για τις γονιδιακές αποκρίσεις, τα συστατικά του ΦΒΣ1 είχαν αποδειχθεί ότι απορροφώνται κυρίως στο πρόσθιο κομμάτι του εντέρου (π.χ. στομάχι και δωδεκαδάκτυλος) (Michiels et al., 2008). Όπως παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη, τα 8 από τα 13 εξεταζόμενα γονίδια αυξήθηκαν στον δωδεκαδάκτυλο κατά την προσθήκη ΦΒΣ1.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν αυξημένη αντιοξειδωτική κατάσταση στα ορνίθια με τις επεμβάσεις της χαμηλότερης πρόσληψης ενέργειας και πρωτεΐνης. Ειδικότερα, οι χαμηλές προδιαγραφές σιτηρεσίου αύξησαν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταροπροστασία κυρίως στα τυφλά. Η μειωμένη πρόσληψη ενέργειας έχει αποδειχθεί ότι υποστηρίζει την εξάλειψη κατεστραμμένων πρωτεϊνών και οξειδωμένων λιπιδίων και αυξάνει τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς σε ανθρώπους (Fontana, 2009), αρουραίους και πιθήκους (Zainal et al., 2000; Cho et al., 2003). Επιπλέον, οι επιδράσεις των μειωμένων προδιαγραφών σιτηρεσίου για άλλους βιοδείκτες της υγείας του εντέρου (TLR και πρωτεΐνες στενού συνδέσμου) έχουν μελετηθεί στα τυφλά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Paraskeuas and Mountzouris, 2019b).

Επίσης η αύξηση του *Keap1* στο δωδεκαδάκτυλο στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε να θεωρηθεί σχετική με τη συνολική διαχείριση της φλεγμονής του εντέρου, καθώς το

Keap1, εκτός από την ενεργό συμμετοχή του στο μονοπάτι Nrf2 (Jung and Kwak, 2010), αναστέλλει επίσης τον *NF-kB1* μέσω της δέσμευσης της πρωτεΐνης-ενεργοποιητή *Ikkb* (Kostyuk et al., 2018). Η αύξηση του *Keap1* και η παράλληλη μείωση του *NF-kB1* έχουν πρόσφατα αποδειχθεί στην περίπτωση μιας μελέτης με ΦΒΣ σε ορνίθια κρεοπαραγωγής (Mountzouris et al., 2020).

Η προσθήκη ΦΒΣ1 αύξησε τις εκφράσεις *CAT* και *SOD1* στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου. Αυξημένη δραστηριότητα *CAT* και *SOD1* έχει παρατηρηθεί στο αίμα των ορνιθίων μετά την προσθήκη ΦΒΣ (Ahmadi, 2010), ενώ από άλλους παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση σε αυτά τα δύο ένζυμα με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (καρβακρόλη) σε επιθηλιακά κύτταρα λεπτού εντέρου χοίρου (Zou et al., 2016). Επιπλέον, μια σημαντική αύξηση της έκφρασης *SOD1* στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του τυφλού έχει παρατηρηθεί σε μια μελέτη ΦΒΣ σε ορνίθια κρεοπαραγωγής (Mountzouris et al., 2020).

Ανεξάρτητα από τον τύπο του σιτηρεσίου, η χορήγηση ΦΒΣ1 αύξησε το *NQO1* στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου. Σε άλλη μελέτη, η αύξηση της έκφρασης του *NQO1* στο δωδεκαδάκτυλο φάνηκε επίσης μετά από την προσθήκη ΦΒΣ (Mountzouris et al., 2020). Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη, η προσθήκη ΦΒΣ οδήγησε σε αυξημένες εκφράσεις *GSR*, *PRDX1* και *TXN* στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου. Αν και δεν υπάρχουν άλλες σχετικές μελέτες για άμεση σύγκριση, έχει αναφερθεί αύξηση της ρύθμισης του *PRDX1* στην περίπτωση άλλων προσθέτων που ρυθμίζουν τη λειτουργία του εντέρου, όπως οι ολιγοσακχαρίτες μαννάνης σε νεαρά ορνίθια κρεοπαραγωγής (Xiao et al., 2012).

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές σχετικά με την ένταση των αποτελεσμάτων αλλά και σχετικά με την εξειδίκευση της εντερικής θέσης της διαμόρφωσης των συστατικών του ΦΒΣ1 στο μονοπάτι του Nrf2, το οποίο αποδεικνύεται και από τα αποτελέσματα άλλων μελετών (Mueller et al., 2012; Paraskeuas and Mountzouris, 2019b; Mountzouris et al., 2020). Είναι πιθανό ότι η σύνθεση των ΦΒΣ1, το επίπεδο προσθήκης και η κινητική απορρόφησης και μεταβολισμού των δραστικών συστατικών των ΦΒΣ στα πτηνά, θα μπορούσαν ενδεχομένως να ευθύνονται για τις διαφορές μεταξύ των μελετών.

Παράλληλα, σε αυτή τη μελέτη, η προσθήκη ΦΒΣ1 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ΟΑΙ στη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά. Ομοίως, οι επιδράσεις του ΦΒΣ στο έντερο των

ορνιθίων σε μοριακό επίπεδο έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι συσχετίζονται με αυξημένη ΟΑΙ του εντερικού βλεννογόνου (Mountzouris et al., 2020).

Τέλος, όσον αφορά για τα γονίδια που σχετίζονται με τον εντερικό φραγμό τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καθαρά ένα μοτίβο στατιστικά σημαντικής αύξησης ή μείωσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο είδος του ΦΒΣ1 που χρησιμοποιήθηκε καθώς η δράση τους διαφοροποιείται ανάλογα με τα φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται (Krauze, 2021). Τα συγκεκριμένα ΦΒΣ όπως επίσης και ο τύπος σιτηρεσίου δεν έδειξαν να επηρεάζουν σημαντικό αριθμό γονιδίων έτσι ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα με βάση το μονοπάτι του εντερικού φραγμού για αυτό και υπήρξε η αναγκαιότητα μελέτης διαφορετικών μονοπατιών για να εξηγηθούν οι μηχανισμοί δράσης της διατροφής στα παραγωγικά χαρακτηριστικά.

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε τα προηγούμενα ευρήματά της ομάδας του εργαστηρίου σχετικά με την απόδοση (Mountzouris et al., 2011; Paraskeuas et al., 2016) και παρείχε νέες γνώσεις για τις επιδράσεις της μειωμένης ενέργειας και πρωτεΐνης στην απόκριση των αντιοξειδωτικών. Παρατηρήθηκε πιο έντονη αντιοξειδωτική απόκριση του οργανισμού σε πτηνά που ταΐστηκαν με το σιτηρέσιο μειωμένων διατροφικών προδιαγραφών. Επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα του ΦΒΣ1 για αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού, για αποτοξίνωση και διαχείριση φλεγμονής σε εντερικό επίπεδο. Είναι ενδιαφέρον ότι αποδείχθηκε ότι όταν το ΦΒΣ1 χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το σιτηρέσιο χαμηλών προδιαγραφών, το δυναμικό κυτταροπροστασίας στο έντερο μεγιστοποιήθηκε. Από ανθρώπινη σκοπιά, και δεδομένης της ομολογίας (άνω του 60%) του γονιδιώματος μεταξύ του Gallus gallus και του ανθρώπινου γονιδιώματος (Lagerström et al., 2006), τα ευρήματα της μελέτης θα μπορούσαν επίσης να είναι σημαντικά για την εντερική υγεία του ανθρώπου καθώς αυξάνονται οι σύγχρονες διατροφικές συστάσεις για μειωμένη πρόσληψη τροφής και χρήση φυτικών βιοδραστικών ενώσεων.

5. Κεφάλαιο 5-Προσδιορισμός των επιδράσεων του τύπου σιτηρεσίου και της χορήγησης ΦΒΣ στη σηματοδότηση των μονοπατιών TLR, MAPK και των κρίσιμων γονιδιακών συστατικών του μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής

5.1. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να εμβαθύνει σε ορισμένους βιοδείκτες που εμπλέκονται σε μονοπάτια που σχετίζονται με τον έλεγχο της φλεγμονής, την κυτταρική απόπτωση, τη σύνθεση πρωτεϊνών και τον μεταβολισμό στο έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε συνέχεια του πειράματος της 1^{ης} μελέτης. Συγκεκριμένα, η έκφραση κρίσιμων γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης TLR καθώς και η κυτταρική απόπτωση (μονοπάτι MAPK) και η κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμός (μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση γονιδιωματικής κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων.

5.2. Υλικά και μέθοδοι

5.2.1. Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις

βλ. Κεφάλαιο 4.2.1

5.2.2. Δειγματοληψία ιστών

βλ. Κεφάλαιο 4.2.3

5.2.3. Μοριακές αναλύσεις (απομόνωση RNA, παρασκευή cDNA)

βλ. Κεφάλαιο 4.2.4

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Εξετάστηκαν τα ακόλουθα γονίδια για *Gallus gallus*: Toll-like υποδοχέας 2B (*TLR2B*), Toll-like υποδοχέας 3 (*TLR3*), Toll-like υποδοχέας 4 (*TLR4*), πρωτεΐνη προσαρμογέας του υποδοχέα toll-like (*TRIF*), πρωτεΐνη προσαρμογέας MyD88 (*MyD88*), μεταγραφικός παράγοντας IRF3/ επαγωγέας ιντερφερόνης άλφα (*IRF3*), μεταγραφικός

παράγοντας Nfkb (*NFkB1*), ιντερλευκίνη 6 (*IL6*), ιντερλευκίνη 8 (*IL8*), ιντερφερόνη-βήτα (*IFN γ*), παράγοντας νέκρωσης όγκων (*LITAF*), μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (*TGF β 1*), υποδοχέας θανάτου στην επιφάνεια των κυττάρων Fas (*APO-1/FAS*), πρωτοογκογονίδιο HRAS/GTPase (*HRAS*), πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο (*MEK*), πρωτεϊνική κινάση 9 ενεργοποιούμενη από μιτογόνο (*MAPK9*), αναστολέας του *NFkB1* (*CHUK*), υπομονάδα μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (*FOS*), υπομονάδα μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (*JUN*), φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5-διφωσφορική-καταλυτική υπομονάδα κινάσης άλφα (*PIK3CA*), άλφα κινάση σερίνης/θρεονίνης (*AKT1*), πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (*AMPK*), γονίδιο οζώδους σκλήρυνσης-2 (*TSC2*), στόχος ραπαμυκίνης (*mTOR*), πρωτεΐνη δέσμευσης ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 4E (*4E-BP1*) και κινάση B1 της ριβοσωματικής πρωτεΐνης S6 (*S6K1*). Οι κατάλληλοι εκκινητές δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες GenBank που συλλέχθηκαν από το Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας και την Εθνική Βιβλιοθήκη Ιατρικής των ΗΠΑ (NCBI) εκτός από 10 από αυτούς που ήταν από άλλες αναφορές που φαίνονται στον Πίνακα 5.1. Οι εκκινητές επιβεβαιώθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο PRIMER BLAST για βάσεις δεδομένων mRNA *Gallus gallus* για να διαπιστωθεί ότι υπήρχε ένα μοναδικό αμπλικόνιο.

Πίνακας 5.1. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μελέτη.

Γονίδια στόχοι	Ακολουθία εκκινητών (5'-3') ¹	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR-cDNA (bp)	Αριθμός πρόσβασης GenBank
<i>GAPDH</i>	F: ACTTTGGCATTGTGGAGGGT R: GGACGCTGGGATGATGTTCT	59.5	131	NM_204305.1
<i>ACTB</i>	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAGTGGTACG	60	101	NM_205518.1
TLR μονοπάτι				
<i>TLR2B</i>	F: CTTGGAGATCAGAGTTTGGG R: ATTTGGGAATTTGAGTGCTG	62	238	NM_001161650.1
<i>TLR3</i>	F: GCTTGGTTTGCTAGTTGGCT R: ACCGTGATATTTAGGCGGGG	59.5	93	NM_001011691.3
<i>TLR4</i>	F: GTCTCTCCTTCCTTACCTGCTGTTC R: AGGAGGAGAAAGACAGGGTAGGTG	64.5	187	NM_001030693.1
<i>TRIF</i>	F: TCAGCCATTCTCCGTCCTCTTC R: GGTCAGCAGAAGGATAAGGAAAGC	62	339	NM_001081506.1
<i>MyD88</i>	F: AATGGACACTGAGCTCTGCC R: CAAACCCGATCTGTGGGACA	60	126	NM_001030962.3
<i>IRF3</i>	F: GAGGATCCGGCCAAATGGAA R: GCCAAATCGTGGTGGTTGAG	60	212	NM_205372.1
<i>NFκB1</i>	F: GAAGGAATCGTACCGGGAACA R: CTCAGAGGGCCTTGTGACAGTAA	59	131	NM_205134.1
<i>IL6</i>	F: AAATCCCTCCTCGCCAATCT R: CCCTCACGGTCTTCTCCATAAA	59	106	NM_204628.1

<i>IL8</i>	F: CAGGTGACACCCGGAAGAAA R: CTGAACGTGCCTGAGCCATA	61	117	NM_205018.1
<i>IFNW</i>	F: CCTCAACCAGATCCAGCATTAC R: CCCAGGTACAAGCACTGTAGTT	60.5	167	NM_001024836.1
<i>LITAF</i>	F: GAGCAGGGCTGACACGGAT R: GCACAAAAGAGCTGATGGCAG	60	149	NM_204267.1
<i>TGFB1</i>	F: GGTATATGGCCAACTTCTGCAT R: CCCCGGGTTGTGTTGGT	60	102	JQ423909.1
MAPK μονοπάτι				
<i>APO-1 (FAS)</i>	F: ACACCCGCTATTTGGGAGAC R: GAACTTGGTGGCGTTGGAGA	62	134	NM_205344.1
<i>HRAS</i>	F: GCAAGCTGAACCCACCAGAT R: TCTCCAAGTCAGGGTCCAGT	60	93	NM_205292.1
<i>MEK</i>	F: GAAGTTTGCTTCGCGTCGGG R: GGCTTCTTCTTGGGCATGTTG	62	111	NM_001005830.1
<i>MAPK9</i>	F: TTGGACTGGCAAGAACAGCG R: AAGGATAACCTCTGGCGCTC	62	86	NM_205095.1
<i>CHUK (IKK)</i>	F: TTCACTGGTAAGCTCCAGCC R: TTCTCTGCCTCCTGCAACA	60	199	NM_001012904.1
<i>FOS</i>	F: GCCGACATGATGTACCAGGG R: GACGGGTAGTAGGTGAGGCT	62	101	NM_205508.1
<i>JUN</i>	F: CCTCCCCTGTCCCCTATTGA R: CCTTTTCCGGCATTGACG	61.5	99	NM_001031289.1
PI3K-Akt-mTOR μονοπάτι				

<i>PIK3CA</i>	F: ATGCCATCTTACTCCAGGCG R: TAGTCCAGAGGGACTTGGCT	61	79	NM_001004410.1
<i>AKT1</i>	F: CATCCCTTTTGTGGACCCTTCT R: CGGGAATGTCTCTTGGTGGAT	61	102	NM_205055.1
<i>AMPK</i>	F: CGGCAGATAAACAGAAGCACGAG R: CGATTCAGGATCTTCACTGCAAC	62.5	148	NM_001039603.1
<i>TSC2</i>	F: TGTGGTTCATTTCGGTGTCGT R: TGGCCTCTCATTGAGGCTTG	61	149	XM_015294446.2
<i>mTOR</i>	F: GGTGATGACCTTGCCAAACT R: CTCTTGTCATCGCAACCTCA	60	220	XM_417614
<i>4EBP1</i>	F: GCGAATGTAGGTGAAGAAGAG R: AACAGGAAGGCACTCAAGG	60	146	XM_424384.5
<i>S6K1</i>	F: CAATTTGCCTCCCTACCTCA R: AAGGAGGTTCCACCTTTCGT	59.5	176	NM_001030721.1

¹F: Πρόσθιος, R: Ανάστροφος.

Συνέχεια στο κεφάλαιο 4.2.4.

5.2.4. Στατιστική ανάλυση

βλ. Κεφάλαιο 4.2.6

5.3. Αποτελέσματα

5.3.1. Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Βλ. κεφάλαιο 4.3.1

5.3.2. Σχετική Έκφραση των κρίσιμων Γονιδίων που μελετήθηκαν

Τα αποτελέσματα σχετικής γονιδιακής έκφρασης παρουσιάστηκαν ξεκινώντας από τις στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ σιτηρεσίου και ΦΒΣ1 και συνεχίζοντας τις σημαντικές επιδράσεις τύπου σιτηρεσίου και ΦΒΣ1 ανά εντερικό τμήμα και ομαδοποιούνται σε δύο πίνακες ανά τμήμα με βάση το εμπλεκόμενο μονοπάτι.

Δωδεκαδάκτυλος

Στο δωδεκαδάκτυλο οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων που μελετήθηκαν παρατίθενται στους Πίνακες 5.2 και 5.3. Σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ διατροφής και προσθήκης ΦΒΣ1 φάνηκε μόνο για ένα γονίδιο το *mTOR* ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.040$) με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής στην επέμβαση Η- να εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τα δεδομένα άλλων επεμβάσεων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Σε σύγκριση με τις συνιστώμενες προδιαγραφές, το μειωμένο σιτηρέσιο προδιαγραφών με μείωση κατά 95% είχε ως αποτέλεσμα την ανοδική ρύθμιση των *myD88* ($P_{\Delta} = 0.035$) και *PIK3CA* ($P_{\Delta} < 0.001$) και μείωση της ρύθμισης του *APO1* ($P_{\Delta} = 0.015$) και του *mTOR* ($P_{\Delta} = 0.021$) στο δωδεκαδάκτυλο (Πίνακες 5.2 και 5.3). Όσον αφορά τις επιδράσεις του ΦΒΣ1, η προσθήκη του ΦΒΣ1 μείωσε την έκφραση των *TLR2B* ($P_{\Phi} = 0.012$), *MyD88* ($P_{\Phi} = 0.009$), *IL8* ($P_{\Phi} = 0.017$), ενώ αύξησε την έκφραση του *HRAS* ($P_{\Phi} = 0.031$).

Πίνακας 5.2. Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like (*TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*), μόρια-υποδοχείς (*TRIF*, *MyD88*), μεταγραφικοί παράγοντες (*IRF3*, *NFκB1*), Ιντερλευκίνη 6 (*IL6*), Ιντερλευκίνη 8 (*IL8*), Ιντερφερόνη βήτα (*IFNW*), παράγοντας νέκρωσης όγκων (*LITAF*) και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (*TGFβ1*) στο επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Δωδεκαδάκτυλος	Γονίδια	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM	Δ	p-Values ³	
		L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
TLR μονοπάτι	<i>TLR2B</i>	1.64	1.01	1.88 ^Y	0.77 ^X	0.343	0.092	0.012	0.060
	<i>TLR3</i>	1.28	1.00	1.19	1.09	0.170	0.112	0.562	0.781
	<i>TLR4</i>	1.33	1.17	1.33	1.18	0.274	0.562	0.589	0.719
	<i>TRIF</i>	1.13	1.03	1.20	0.97	0.132	0.466	0.093	0.481
	<i>MyD88</i>	1.30 ^B	0.97 ^A	1.34 ^Y	0.93 ^X	0.150	0.035	0.009	0.263
	<i>IRF3</i>	1.08	1.43	1.24	1.27	0.327	0.288	0.925	0.965
	<i>NFκB1</i>	1.15	0.98	1.12	1.01	0.129	0.185	0.395	0.585
	<i>IL6</i>	1.29	0.93	0.98	1.24	0.207	0.084	0.227	0.573
	<i>IL8</i>	1.19	0.96	1.41 ^Y	0.74 ^X	0.265	0.406	0.017	0.161
	<i>IFNW</i>	1.12	1.08	1.19	1.02	0.149	0.573	0.294	0.450
	<i>LITAF</i>	1.46	1.26	1.40	1.32	0.257	0.437	0.761	0.110
	<i>TGF</i>	1.28	0.99	1.20	1.07	0.182	0.125	0.491	0.633

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Πίνακας 5.3. Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση (*APO1*, *HRAS*, *MEK*, *MAPK9*, *CHUK*, *FosB* and *JunD*) και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό (*PIK3CA*, *AKT1*, *AMPK*, *TSC2*, *mTOR*, *4EBP1*, *S6K1*) στο επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Δωδεκαδάκτυλος		Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²			p-Values ³		
	Γονίδια	L	H	-	+	SEM	Δ	Φ	Δ×Φ
MAPK μονοπάτι	<i>APO1</i>	0.89 ^A	1.25 ^B	1.05	1.10	0.138	0.015	0.723	0.952
	<i>HRAS</i>	1.11	1.15	0.91 ^X	1.35 ^Y	0.194	0.833	0.031	0.720
	<i>MEK</i>	0.98	1.11	0.95	1.14	0.098	0.188	0.065	0.858
	<i>MAPK9</i>	1.22	1.01	1.26	0.97	0.181	0.252	0.123	0.858
	<i>CHUK</i>	1.18	1.00	1.11	1.06	0.150	0.228	0.738	0.281
	<i>FOS</i>	1.16	1.36	1.46	1.06	0.325	0.551	0.221	0.384
	<i>JUN</i>	0.97	1.21	1.04	1.14	0.153	0.132	0.538	0.360
PI3K-Akt- mTOR μονοπάτι	<i>PIK3CA</i>	1.99 ^B	0.92 ^A	1.67	1.24	0.277	<0.001	0.131	0.095
	<i>AKT1</i>	1.09	1.04	1.04	1.09	0.141	0.758	0.728	0.966
	<i>AMPK</i>	1.12	1.06	1.06	1.13	0.177	0.729	0.706	0.496
	<i>TSC2</i>	2.02	1.31	1.91	1.42	0.444	0.118	0.280	0.841
	<i>mTOR</i>	0.98 ^A	1.23 ^B	1.08	1.13	0.105	0.021	0.592	0.040
	<i>4EBP1</i>	1.14	1.00	0.98	1.16	0.132	0.304	0.184	0.468
	<i>S6K1</i>	1.00	1.13	1.02	1.11	0.153	0.409	0.569	0.883

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Νήστιδα

Στη νήστιδα, οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων που μελετήθηκαν παρατίθενται στους Πίνακες 5.4 και 5.5. Μια σημαντική αλληλεπίδραση του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 φάνηκε μόνο για την *IL8* ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.030$), με την επέμβαση Η- να δείχνει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση στις άλλες τρεις επεμβάσεις (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Σε σύγκριση με τις συνιστώμενες προδιαγραφές, το μειωμένο σιτηρέσιο προδιαγραφών με μείωση κατά 95% είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των *TLR4* ($P_{\Delta} = 0.004$), *NFkB1* ($P_{\Delta} = 0.022$) και *IL6* ($P_{\Delta} = 0.021$) και τη μείωση του *FOS* ($P_{\Delta} = 0.022$) στη νήστιδα (Πίνακες 5.4 και 5.5). Παράλληλα, η προσθήκη ΦΒΣ1 μείωσε την έκφραση της *IL8* ($P_{\Phi} = 0.001$), *APO1* ($P_{\Phi} = 0.015$) και *FOS* ($P_{\Phi} = 0.029$) στη νήστιδα.

Πίνακας 5.4. Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like (*TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*), μόρια-υποδοχείς (*TRIF*, *MyD88*), μεταγραφικοί παράγοντες (*IRF3*, *NFκB1*), Ιντερλευκίνη 6 (*IL6*), Ιντερλευκίνη 8 (*IL8*), Ιντερφερόνη βήτα (*IFNW*), παράγοντας νέκρωσης όγκων (*LITAF*) και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (*TGFB1*) στο επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Νήστιδα	Γονίδια	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM	Δ	p-Values ³	
		L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
TLR μονοπάτι	<i>TLR2B</i>	1.26	1.30	1.55	1.02	0.355	0.916	0.143	0.712
	<i>TLR3</i>	1.38	1.16	1.46	1.08	0.163	0.355	0.111	0.293
	<i>TLR4</i>	1.53 ^B	0.85 ^A	1.27	1.11	0.219	0.004	0.489	0.483
	<i>TRIF</i>	1.09	0.98	1.02	1.06	0.094	0.427	0.750	0.918
	<i>MyD88</i>	1.33	0.94	1.18	1.09	0.136	0.054	0.669	0.127
	<i>IRF3</i>	1.18	1.14	1.27	1.05	0.220	0.885	0.343	0.865
	<i>NFκB1</i>	1.18 ^B	0.94 ^A	1.16	0.96	0.100	0.022	0.060	0.643
	<i>IL6</i>	1.54 ^B	0.95 ^A	1.30	1.19	0.246	0.021	0.670	0.414
	<i>IL8</i>	1.33	1.39	1.85 ^Y	0.87 ^X	0.195	0.808	0.001	0.030
	<i>IFNW</i>	1.01	1.28	1.09	1.20	0.099	0.058	0.415	0.239
	<i>LITAF</i>	1.46	1.15	1.52	1.10	0.287	0.286	0.156	0.601
	<i>TGF</i>	1.17	1.12	1.21	1.08	0.211	0.831	0.539	0.614

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Πίνακας 5.5. Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση (*APO1*, *HRAS*, *MEK*, *MAPK9*, *CHUK*, *FosB* and *JunD*) και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό (*PIK3CA*, *AKT1*, *AMPK*, *TSC2*, *mTOR*, *4EBP1*, *S6K1*) στο επιθήλιο της νήστιδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Νήστιδα	Γονίδια	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM	Δ	p-Values ³	
		L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
ΜΑΡΚ μονοπάτι	<i>APO1</i>	1.01	1.16	1.29 ^Y	0.89 ^X	0.156	0.326	0.015	0.399
	<i>HRAS</i>	1.07	1.08	1.15	0.99	0.132	0.953	0.233	0.920
	<i>MEK</i>	1.14	1.13	1.24	1.03	0.183	0.974	0.253	0.789
	<i>MAPK9</i>	1.12	1.07	1.23	0.96	0.157	0.793	0.089	0.496
	<i>CHUK</i>	1.10	1.03	1.08	1.05	0.124	0.593	0.796	0.587
	<i>FOS</i>	0.94 ^A	1.52 ^B	1.50 ^Y	0.95 ^X	0.240	0.022	0.029	0.095
	<i>JUN</i>	1.03	1.21	1.25	0.99	0.179	0.343	0.157	0.241
PI3K-Akt- mTOR μονοπάτι	<i>PIK3CA</i>	1.25	1.05	1.29	1.01	0.211	0.345	0.199	0.855
	<i>AKT1</i>	1.13	1.04	1.12	1.04	0.144	0.559	0.574	0.514
	<i>AMPK</i>	1.23	1.02	1.26	0.99	0.163	0.218	0.113	0.200
	<i>TSC2</i>	1.31	0.98	1.21	1.08	0.224	0.149	0.583	0.499
	<i>mTOR</i>	1.10	1.02	1.12	1.00	0.091	0.526	0.389	0.494
	<i>4EBP1</i>	0.99	1.17	1.18	0.99	0.143	0.224	0.194	0.812
	<i>S6K1</i>	1.06	1.09	1.13	1.02	0.140	0.853	0.453	0.890

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Ειλεός

Στον ειλεό, οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων που μελετήθηκαν παρατίθενται στους Πίνακες 5.6 και 5.7. Μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 φάνηκε μόνο για το γονίδιο *HRAS* ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.005$). Συγκεκριμένα, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *HRAS* φάνηκαν στα ορνίθια κρεοπαραγωγής της επέμβασης L- σε σύγκριση με τις άλλες τρεις επεμβάσεις (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Σε σύγκριση με τις συνιστώμενες προδιαγραφές 100% ΜΕ και ΟΠ, το σιτηρέσιο προδιαγραφών 95% είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των *TLR3* ($P_{\Delta} = 0.048$), *TRIF* ($P_{\Delta} = 0.046$), *MyD88* ($P_{\Delta} = 0.001$), *APO1* ($P_{\Delta} = 0.023$), *CHUK* ($P_{\Delta} = 0.001$), *AMPK* ($P_{\Delta} = 0.026$), *TSC2* ($P_{\Delta} < 0.001$) και *mTOR* ($P_{\Delta} < 0.001$) στον ειλεό (Πίνακες 5.6 και 5.7). Η προσθήκη ΦΒΣ1 μείωσε την ειλεακή έκφραση του *LITAF* ($P_{\Phi} = 0.047$).

Πίνακας 5.6. Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like (*TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*), μόρια-υποδοχείς (*TRIF*, *MyD88*), μεταγραφικοί παράγοντες (*IRF3*, *NFκB1*), Ιντερλευκίνη 6 (*IL6*), Ιντερλευκίνη 8 (*IL8*), Ιντερφερόνη βήτα (*IFNW*), παράγοντας νέκρωσης όγκων (*LITAF*) και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (*TGFβ1*) στο επιθήλιο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Είλεός	Γονίδια	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM ⁴	Δ	p-Values ³	
		L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
TLR μονοπάτι	<i>TLR2B</i>	1.64	0.91	1.53	1.02	0.391	0.068	0.850	0.252
	<i>TLR3</i>	1.35 ^B	0.96 ^A	1.28	1.02	0.190	0.048	0.195	0.241
	<i>TLR4</i>	1.07	1.20	1.25	1.03	0.189	0.481	0.252	0.733
	<i>TRIF</i>	1.19 ^B	0.93 ^A	1.08	1.05	0.124	0.046	0.820	0.364
	<i>MyD88</i>	1.39 ^B	0.85 ^A	1.20	1.03	0.143	0.001	0.252	0.797
	<i>IRF3</i>	1.18	1.46	1.36	1.29	0.343	0.414	0.845	0.355
	<i>NFκB1</i>	1.21	0.98	1.12	1.06	0.149	0.135	0.682	0.210
	<i>IL6</i>	1.27	1.08	1.35	1.00	0.233	0.408	0.147	0.111
	<i>IL8</i>	1.02	1.09	1.04	1.08	0.158	0.750	0.845	0.673
	<i>IFNW</i>	1.05	1.03	1.03	1.05	0.083	0.836	0.880	0.085
	<i>LITAF</i>	1.59	1.43	1.91 ^Y	1.12 ^X	0.381	0.668	0.047	0.798
	<i>TGF</i>	1.41	1.01	1.29	1.13	0.309	0.202	0.602	0.477

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Πίνακας 5.7. Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση (*APO1*, *HRAS*, *MEK*, *MAPK9*, *CHUK*, *FosB* and *JunD*) και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό (*PIK3CA*, *AKT1*, *AMPK*, *TSC2*, *mTOR*, *4EBP1*, *S6K1*) στο επιθήλιο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Ειλεός	Γονίδια	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM ⁴	p-Values ³		
		L	H	-	+		Δ	Φ	Δ×Φ
MAPK μονοπάτι	<i>APO1</i>	1.23 ^B	0.92 ^A	1.09	1.06	0.129	0.023	0.814	0.299
	<i>HRAS</i>	1.11	1.03	1.08	1.05	0.120	0.514	0.815	0.005
	<i>MEK</i>	0.97	1.34	1.09	1.22	0.241	0.134	0.595	0.089
	<i>MAPK9</i>	1.18	0.99	1.08	1.10	0.143	0.189	0.902	0.586
	<i>CHUK</i>	1.40 ^B	0.89 ^A	1.22	1.07	0.140	0.001	0.275	0.403
	<i>FOS</i>	1.56	1.14	1.35	1.35	0.363	0.254	0.984	0.426
	<i>JUN</i>	1.36	0.99	1.20	1.16	0.233	0.125	0.859	0.635
PI3K-Akt- mTOR μονοπάτι	<i>PIK3CA</i>	1.14	1.06	1.20	1.01	0.166	0.640	0.254	0.206
	<i>AKT1</i>	1.02	1.15	0.99	1.17	0.142	0.375	0.214	0.620
	<i>AMPK</i>	1.40 ^B	0.92 ^A	1.23	1.09	0.201	0.026	0.509	0.523
	<i>TSC2</i>	2.49 ^B	1.02 ^A	1.74	1.77	0.307	<0.001	0.941	0.902
	<i>mTOR</i>	1.41 ^B	0.84 ^A	1.09	1.17	0.123	<0.001	0.482	0.113
	<i>4EBP1</i>	1.10	1.08	1.06	1.13	0.157	0.911	0.659	0.736
<i>S6K1</i>	1.12	0.98	1.09	1.01	0.106	0.191	0.421	0.162	

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Τυφλά έντερα

Στα τυφλά έντερα, οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων που μελετήθηκαν παρατίθενται στους Πίνακες 5.8 και 5.9. Μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 φάνηκε μόνο για το γονίδιο *IL8* ($P_{\Delta \times \Phi} = 0.022$), με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής στην επέμβαση L- να εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τις άλλες τρεις επεμβάσεις (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Σε σύγκριση με τις συνιστώμενες προδιαγραφές 100% ΜΕ και ΟΠ, το σιτηρέσιο προδιαγραφών με 95% ΜΕ και ΟΠ, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των *TRIF* ($P_{\Delta} = 0.031$), *IL6* ($P_{\Delta} = 0.022$), *IL8* ($P_{\Delta} = 0.003$), *IFNW* ($P_{\Delta} = 0.016$), *TGF* ($P_{\Delta} = 0.003$), *MAPK9* ($P_{\Delta} = 0.021$), *CHUK* ($P_{\Delta} = 0.012$), *TSC2* ($P_{\Delta} = 0.009$) και μείωση του *4EBP1* ($P_{\Delta} = 0.011$) στα τυφλά έντερα (Πίνακες 5.8 και 5.9). Η προσθήκη ΦΒΣ1 μείωσε την έκφραση των *TLR3* ($P_{\Phi} = 0.012$), *MyD88* ($P_{\Phi} = 0.040$), *TSC2* ($P_{\Phi} = 0.042$), ενώ αύξησε την έκφραση του *4EBP1* ($P_{\Phi} < 0.001$) στα τυφλά.

Πίνακας 5.8. Σχετική γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων Toll-like (*TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*), μόρια-υποδοχείς (*TRIF*, *MyD88*), μεταγραφικοί παράγοντες (*IRF3*, *NFκB1*), Ιντερλευκίνη 6 (*IL6*), Ιντερλευκίνη 8 (*IL8*), Ιντερφερόνη βήτα (*IFN γ*), παράγοντας νέκρωσης όγκων (*LITAF*) και μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (*TGFβ1*) στο επιθήλιο των τυφλών εντέρων ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Τυφλά	Γονίδια	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM ⁴	Δ	p-Values ³	
		L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
TLR μονοπάτι	<i>TLR2B</i>	1.53	0.98	1.43	1.09	0.311	0.086	0.281	0.658
	<i>TLR3</i>	1.25	1.11	1.43 ^Y	0.93 ^X	0.186	0.461	0.012	0.124
	<i>TLR4</i>	1.35	0.97	1.20	1.13	0.217	0.085	0.749	0.573
	<i>TRIF</i>	1.24 ^B	0.93 ^A	1.10	1.08	0.137	0.031	0.917	0.138
	<i>MyD88</i>	1.49	0.81	1.26 ^Y	1.04 ^X	0.181	0.300	0.040	0.126
	<i>IRF3</i>	1.43	1.22	1.40	1.25	0.347	0.545	0.663	0.136
	<i>NFκB1</i>	1.22	0.98	1.16	1.04	0.186	0.208	0.528	0.127
	<i>IL6</i>	1.54 ^B	0.90 ^A	1.21	1.24	0.266	0.022	0.911	0.504
	<i>IL8</i>	1.54 ^B	0.73 ^A	1.26	1.01	0.254	0.003	0.330	0.022
	<i>IFNγ</i>	1.35 ^B	0.90 ^A	1.20	1.05	0.175	0.016	0.407	0.557
	<i>LITAF</i>	1.61	1.36	1.58	1.39	0.357	0.483	0.607	0.292
	<i>TGF</i>	1.81 ^B	0.84 ^A	1.30	1.34	0.299	0.003	0.889	0.880

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0.05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

Πίνακας 5.9. Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση (*APO1*, *HRAS*, *MEK*, *MAPK9*, *CHUK*, *FosB* and *JunD*) και γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό (*PIK3CA*, *AKT1*, *AMPK*, *TSC2*, *mTOR*, *4EBP1*, *S6K1*) στο επιθήλιο του ειλεού ορνιθίων κρεοπαραγωγής 42 ημερών.

Τυφλά	Gene	Τύπος σιτηρεσίου ¹		Προσθήκη ΦΒΣ1 ²		SEM ⁴	Δ	p-Values ³	
		L	H	-	+			Φ	Δ×Φ
MAPK μονοπάτι	<i>APO1</i>	1.12	1.10	1.20	1.02	0.187	0.892	0.346	0.533
	<i>HRAS</i>	1.23	1.04	1.02	1.25	0.207	0.362	0.277	0.682
	<i>MEK</i>	1.09	1.26	1.22	1.13	0.228	0.448	0.668	0.066
	<i>MAPK9</i>	1.52 ^B	1.00 ^A	1.27	1.26	0.213	0.021	0.975	0.147
	<i>CHUK</i>	1.49 ^B	0.91 ^A	1.27	1.12	0.216	0.012	0.477	0.912
	<i>FOS</i>	0.98	0.84	1.01	0.81	0.209	0.511	0.333	0.291
	<i>JUN</i>	1.14	1.14	1.09	1.20	0.212	0.992	0.608	0.872
PI3K-Akt- mTOR μονοπάτι	<i>PIK3CA</i>	1.33	1.02	1.21	1.15	0.228	0.180	0.789	0.733
	<i>AKT1</i>	1.15	1.07	1.07	1.14	0.176	0.637	0.691	0.776
	<i>AMPK</i>	1.14	1.12	1.12	1.14	0.208	0.920	0.899	0.509
	<i>TSC2</i>	1.69 ^B	0.91 ^A	1.60 ^Y	1.00 ^X	0.279	0.009	0.042	0.868
	<i>mTOR</i>	1.12	1.05	1.06	1.11	0.117	0.568	0.627	0.374
	<i>4EBP1</i>	1.64 ^A	2.62 ^B	1.43 ^X	2.83 ^Y	0.360	0.011	<0.001	0.054
	<i>S6K1</i>	1.66	1.46	1.67	1.45	0.200	0.319	0.281	0.208

¹Τύπος σιτηρεσίου: L (95% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ) και H (100% των συνιστομένων προδιαγραφών ΜΕ και ΟΠ). Τα δεδομένα που εμφανίζονται ανά τύπο διατροφής αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για το σιτηρέσιο L, 9 από την επέμβαση L- και 9 από την επέμβαση L+).

²Προσθήκη ΦΒΣ1 (- = 0 mg/kg σιτηρεσίου και + = 150 mg/kg σιτηρεσίου). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται για το ΦΒΣ1 αντιπροσωπεύουν μέσους όρους επεμβάσεων από n = 18 ορνίθια κρεοπαραγωγής (π.χ. για μη προσθήκη ΦΒΣ1, 9 από την επέμβαση L και 9 από την επέμβαση H).

³Εντός της ίδιας στήλης οι τιμές μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική (P < 0,05) διαφορά επισημαίνονται με διαφορετικό εκθέτη για τον τύπο διατροφής (A, B) και για την προσθήκη ΦΒΣ1 (X, Y).

5.4. Συζήτηση

Στην πρώτη μελέτη της ΔΔ αποδείχθηκε ότι η μείωση των διατροφικών συστάσεων για τα ορνίθια κρεοπαραγωγής για διατροφικό μοντέλο με μείωση κατά 5% ΜΕ και ΟΠ, μείωσε την απόδοση των ορνιθίων, αλλά προκάλεσε επίσης μια αντιοξειδωτική απόκριση μέσω της οδού Nrf2 (Griela et al., 2021). Η προσθήκη ΦΒΣ μπορεί να βελτιώσει τις αρνητικές επιπτώσεις των μειωμένων διατροφικών προδιαγραφών στην απόδοση των ορνιθίων και ομοίως να αυξήσει την εντερική συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Bravo et al., 2014; Paraskeuas et al., 2016; Mountzouris et al., 2020; Griela et al., 2021).

Αυτή η μελέτη στόχευσε στην εμβάθυνση των μηχανισμών που διέπουν τις επιδράσεις της διατροφής και των ΦΒΣ1 στην απόδοση των ορνιθίων. Συγκεκριμένα, κρίσιμοι μοριακοί βιοδείκτες των μονοπατιών που ρυθμίζουν τον έλεγχο της φλεγμονής (μονοπάτι TLR), την κυτταρική απόπτωση (μονοπάτι MAPK) και τον μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών (μονοπάτι PI3KCA/Akt/mTOR) μελετήθηκαν κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου των ορνιθίων.

Αρχικά, υπήρξε περιορισμένος αριθμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ του τύπου σιτηρεσίου και της προσθήκης ΦΒΣ1 (*mTOR*, *IL8* και *HRAS*) από τις αλληλεπιδράσεις που αρχικά αναμένονταν. Ωστόσο, ο τύπος σιτηρεσίου άλλαξε σε ποσοστό 8 έως 42%, ανάλογα με το εντερικό τμήμα, τα γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή (TLR μονοπάτι). Οι μοριακοί βιοδείκτες που άλλαξαν στατιστικά ήταν τα *TLR3* και *TLR4*, τα μόρια προσαρμογής *MyD88* και *TRIF*, ο πυρηνικός παράγοντας *NFκB1*, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες *IL6* και *IL8*, η ιντερφερόνη *IFN γ* και ο παράγοντας *TGF*. Στα παραπάνω γονίδια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση με τη χρήση του σιτηρεσίου μειωμένων προδιαγραφών (95% ΜΕ και ΟΠ). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στη μελέτη του Framingham Heart Study Offspring Cohort κατά την οποία αποδείχθηκε ότι η χαμηλότερη πρόσληψη πρωτεϊνών αυξάνει τη φλεγμονώδη απόκριση και το οξειδωτικό στρες (Hruby and Jacques, 2019).

Ακόμα, όσον αφορά την επέμβαση L αύξησε σημαντικούς βιοδείκτες που σχετίζονται με το μοριακό μονοπάτι της κυτταρικής απόπτωσης (MAPK μονοπάτι). Αυτό το γεγονός μπορεί να υποδηλώνει ότι η μειωμένη πρόσληψη ΜΕ και ΟΠ μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με την επέμβαση Η. Ομοίως, ο Patel και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι ο περιορισμός των

θερμίδων αυξάνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων, τη φλεγμονή και την απόπτωση σε ποντίκια G93A (Patel et al., 2010). Επιπροσθέτως, όσον αφορά το μονοπάτι της κυτταρικής ανάπτυξης και της πρωτεϊνοσύνθεσης (μονοπάτι mTOR) το σιτηρέσιο μειωμένων προδιαγραφών οδήγησε σε τροποποίηση κρίσιμων γονιδίων που σημειώθηκε με μειωμένη έκφραση των *mTOR*, *PI3K* και *4EBP1* και αυξημένη έκφραση του *TSC2* σε σύγκριση με το σιτηρέσιο τύπου 100% ΜΕ και ΟΠ. Το mTOR είναι γνωστό ότι ανιχνεύει θρεπτικά συστατικά και καθοδηγεί τα κύτταρα να αυξήσουν την παραγωγή ATP (Laplante and Sabatini, 2012). Επομένως, το γονίδιο του *mTOR* έδειξε ότι αναγνώρισε τη μειωμένη πρόσληψη ενέργειας και θρεπτικών συστατικών στην περίπτωση των προδιαγραφών σιτηρεσίου 95% ΜΕ και ΟΠ το οποίο με τη σειρά του επιβράδυνε τα κύτταρα και καθυστέρησε την ταχεία ανάπτυξη, κάτι που στην παρούσα μελέτη έγινε εμφανές από τη μειωμένη απόδοση ανάπτυξης των ορνιθίων.

Όσον αφορά την προσθήκη του ΦΒΣ1, το ποσοστό στατιστικώς σημαντικών αλλαγών στα γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση της φλεγμονής κυμαινόταν από 8 έως 25% ανάλογα με το εντερικό τμήμα. Μεταξύ των βιοδεικτών που άλλαξαν ήταν το *TLR2B* και το *TLR3*, το μόριο προσαρμογής *MyD88* και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες *IL8* και *TNFa*. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με αρκετές μελέτες που εξετάσαν την προσθήκη ΦΒΣ (Lu et al., 2014; Paraskeuas and Mountzouris, 2019b; Wang et al., 2021). Στην παρούσα μελέτη τα παραπάνω γονίδια μειώθηκαν στην επέμβαση ΦΒΣ1. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η προσθήκη ΦΒΣ1 θα μπορούσε να ρυθμίσει τη βασική γραμμή ελέγχου της φλεγμονής σε χαμηλότερο ομοιοστατικό επίπεδο σε σύγκριση με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονται χωρίς την προσθήκη ΦΒΣ1.

Όσον αφορά το μονοπάτι που σχετίζεται με την κυτταρική απόπτωση (MAPK μονοπάτι) οι επιδράσεις στα γονίδια ήταν λιγότερες από ότι στα γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση με την προσθήκη του ΦΒΣ1. Τα γονίδια που επηρεάστηκαν στατιστικώς σημαντικά ήταν *APO1* και *FOS* στη νήστιδα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Η αναστολή των μονοπατιών NFkB1 και MAPK έχει αναφερθεί ξανά από τη θυμόλη (Liang et al., 2014) όπως επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η καρβακρόλη, η κινναμαλδεΐδη, η κουρκουμίνη και η θυμόλη μπορεί να καταστείλουν το μονοπάτι του MAPK σε χοίρους και κοτόπουλα (Huang and Lee, 2018b).

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία για το μονοπάτι της πρωτεινοσύνθεσης, το *TSC2* είναι γνωστό ότι αναστέλλει την κυτταρική μετάφραση και πρωτεινοσύνθεση αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του *4EBP1* (Inoki et al., 2003). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η προσθήκη του ΦΒΣ1 οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του *TSC2* και την αυξημένη έκφραση του *4EBP1*, σε σύγκριση με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής χωρίς προσθήκη ΦΒΣ1. Δεδομένου ότι η μείωση του *TSC2* προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από έλλειψη ενέργειας (Inoki et al., 2003; Ma et al., 2005) και η αύξηση του *4EBP1* συνδέεται με την πρωτεϊνική σύνθεση, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η προσθήκη του ΦΒΣ επηρεάζει ευεργετικά την κυτταρική ανάπτυξη. Το τελευταίο με τη σειρά του μπορεί να εξηγήσει τα οφέλη στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων κρεοπαραγωγής που αποδεικνύονται με την προσθήκη του ΦΒΣ1, ειδικά σε ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονται με σιτηρέσιο μειωμένων προδιαγραφών.

Τα ευρήματα της 1^{ης} μελέτης μας έδειξαν ότι ο τύπος σιτηρεσίου μειωμένος κατά 5% ΜΕ και ΟΠ μείωσε την απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε σύγκριση είτε με τη διαίτα 100% ενώ η προσθήκη ΦΒΣ1 αύξησε την αντιοξειδωτική απόκριση που μεσολαβεί μέσω της οδού Nrf2 σε σχέση με τη μη συμπερίληψη του ΦΒΣ1 (Griela et al., 2021). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης εξηγούν περαιτέρω τη μειωμένη απόδοση των ορνιθίων που παρατηρείται όταν τα ορνίθια κρεοπαραγωγής τρέφονται με σιτηρέσιο χαμηλών προδιαγραφών ή σιτηρέσιο χωρίς την προσθήκη του ΦΒΣ1. Συγκεκριμένα, παραπάνω παρασχέθηκαν στοιχεία σε σχέση με τη ρύθμιση 3 μονοπατιών που σχετίζονται με τον έλεγχο της φλεγμονής, την κυτταρική απόπτωση και την κυτταρική ανάπτυξη και πρωτεινοσύνθεση. Το σιτηρέσιο υψηλών προδιαγραφών αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει αυτά τα μονοπάτια σε χαμηλότερα ομοιοστατικά επίπεδα, υποδηλώνοντας ότι περισσότερη ενέργεια και θρεπτικά συστατικά διατίθενται για παραγωγικούς σκοπούς. Είναι ενδιαφέρον ότι η προσθήκη του ΦΒΣ1 ενήργησε επίσης με παρόμοιο τρόπο με το σιτηρέσιο υψηλών προδιαγραφών σε σχέση με τη διαμόρφωση των βιοδεικτών των μονοπατιών που αξιολογήθηκαν. Το τελευταίο τεκμηριώνει την ικανότητα του ΦΒΣ1 να εξουδετερώνει τις απώλειες των παραγωγικών χαρακτηριστικών σε μειωμένες προδιαγραφές σιτηρεσίου.

6. Κεφάλαιο 6- Επιδράσεις της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών στην κυτταροπροστατευτική ικανότητα του εντέρου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής

6.1. Σκοπός

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει μια σειρά επιλεγμένων εντερικών μοριακών βιοδεικτών για την ανταπόκρισή τους στα μέγιστα επιτρεπόμενα από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) διατροφικά επίπεδα δεοξυνιβαλενόλης (DON) και φουμονισινών (FUM). Για τους σκοπούς της μελέτης, διαμορφώθηκε ένα δύσπεπτο σιτηρέσιο (De Maesschalck et al., 2015) και μετρήθηκαν οι βιοδείκτες που σχετίζονται με την αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, τη φλεγμονή και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων.

6.2. Υλικά και μέθοδοι

6.2.1. Ζωικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις

Συνολικά 378 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής (Ross 308) μιας ημέρας παραλήφθηκαν από εμπορικό εκκολαπτήριο όπου εμβολιάστηκαν για τη νόσο του Marek, λοιμώδη βρογχίτιδα και τη νόσο του Newcastle. Τα ορνίθια κατανεμήθηκαν τυχαία σε 3 πειραματικές επεμβάσεις για 39 ημέρες. Κάθε επέμβαση είχε 7 επαναληπτικά κλουβιά των 18 ορνιθίων το καθένα. Ακολουθήθηκε ένα πρόγραμμα σιτηρεσίων με βάση τις τρεις φάσεις ανάπτυξης: εναρκτήριο σιτηρέσιο (1 έως 13 ημέρες), σιτηρέσιο ανάπτυξης (14 έως 26 ημέρες) και σιτηρέσιο πάχυνσης (27 έως 39 ημέρες). Η σύνθεση του βασικού σιτηρεσίου σε κάθε φάση ανάπτυξης βασίστηκε στο σιτάλευρο και τη σόγια με προσθήκη ηλιέλαιου, σίκαλης και ελαιοκράμβης.

Οι 3 πειραματικές επεμβάσεις ήταν: DS (δύσπεπτο σιτηρέσιο) χωρίς άλλες προσθήκες που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, DS με προσθήκη DON (5 mg / kg σιτηρεσίου) και DS με προσθήκη FUM (20 mg / kg σιτηρεσίου). Η δεοξυνιβαλενόλη και οι φουμονισίνες προστέθηκαν στο DS, προκειμένου να επιτευχθούν τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια συγκέντρωσης στην ΕΕ για τα ορνίθια, δηλαδή 5 mg δεοξυνιβαλενόλη / kg σιτηρεσίου και 20 mg φουμονισινών / kg σιτηρεσίου, αντίστοιχα (European commission, 2006).

Οι μυκοτοξίνες δεοξινυβαλενόλη και φουμονισίνες για αυτή τη μελέτη παρήχθησαν εμπορικά *in vitro* από έναν μύκητα *Fusarium graminearum* και έναν *Fusarium verticillioides*, αντίστοιχα, και στη συνέχεια καθαρίστηκαν και κρυσταλλώθηκαν (2,21 mg δεοξινυβαλενόλη/g και 13,7 mg φουμονισίνη B1 + φουμονισίνη B2gF) (Biopure – Romer Laboratories Diagnostics GmbH, Tulln, Αυστρία). Σύμφωνα με τις πειραματικές επεμβάσεις, τα σιτηρέσια αναμίχθηκαν με δεοξινυβαλενόλη ή φουμονισίνες έτσι ώστε να ενσωματωθούν στα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια της ΕΕ. Για να εξασφαλιστεί η ομοιογενής κατανομή της μυκοτοξίνης, παρασκευάστηκαν προμίγματα μυκοτοξίνης με ανάμιξη των υλικών καλλιέργειας δεοξινυβαλενόλης ή φουμονισινών σε αλεσμένο σιτάρι σε συγκέντρωση 0,167 mg δεοξινυβαλενόλη/g και 0,667 mg FUM/g, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα προμίγματα ενσωματώθηκαν στα τελικά αντίστοιχα σιτηρέσια ανά επέμβαση (το DS έλαβε μόνο αλεσμένο σιτάρι) σε ποσοστό 3%. Η μόλυνση από μυκοτοξίνες όλων των σιτηρεσίων αξιολογήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με διαδοχική ανίχνευση μάζας (HPLC-MS/MS) (AT-SOP301, Romerlabs, Tulln, Αυστρία). Ελήφθησαν δείγματα από τρεις διαφορετικές θέσεις σε κάθε παρτίδα, στη συνέχεια συγκεντρώθηκαν ανά παρτίδα και αναλύθηκαν για μόλυνση από μυκοτοξίνες. Η τελική συγκέντρωση μυκοτοξίνης στις τελικές τροφές βρέθηκε να είναι σύμφωνα με το σχέδιο. Π.χ. Δεν βρέθηκε νιβαλενόλη, DON, 3-acetylDON, 15-acetylDON, FUM1 ή FUM2 στην επέμβαση DS, και μόνο ένα αμελητέα χαμηλό επίπεδο FUM1 (54 ± 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$) βρέθηκε στο σιτηρέσιο πάχυνσης της επέμβασης DS.

Εναρκτήριο σιτηρέσιο: DON = 3.771 ± 453 μg δεοξινυβαλενόλη/kg, σιτηρέσιο ανάπτυξης: DON = 5.400 ± 648 μg δεοξινυβαλενόλη/kg, σιτηρέσιο πάχυνσης: DON = 3.008 ± 361 μg δεοξινυβαλενόλη/kg Εναρκτήριο σιτηρέσιο για FUM = 20.002 ± 2.002 μg FUM1 και 6.183 ± 742 μg FUM2/kg σιτηρέσιο ανάπτυξης: FUM = 14.748 ± 1.475 μg FUM1 και 5.995 ± 720 μg FUM2/kg και σιτηρέσιο πάχυνσης FUM = 8.134 ± 976 μg FUM1 και 5.959 ± 715 μg FUM2/kg.

Τα ορνίθια κρεοπαραγωγής είχαν πρόσβαση σε τροφή και νερό κατά βούληση και το πείραμα διήρκεσε 39 ημέρες. Το πρόγραμμα φωτισμού ήταν φωτεινό:σκοτεινό (18h: 6h). Το πειραματικό πρωτόκολλο ήταν σύμφωνο με την Οδηγία της ΕΕ για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (EC 43, 2007; EC 63, 2010) και εγκρίθηκε από την αρμόδια εθνική αρχή (Υπουργείο Γεωργίας και Κτηνιατρικής Πολιτικής, Γενική Διεύθυνση Γεωργίας, Οικονομίας, Κτηνιατρικής

και Αλιείας). Τα ορνίθια υποβλήθηκαν σε ευθανασία με αναισθητοποίηση πριν από τη σφαγή.

6.2.2. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων

Τα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων όπως ο ρυθμός αύξησης σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), η κατανάλωση τροφής (ΚΤ) και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ) προσδιορίστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (39 ημέρες).

6.2.3. Δειγματοληψία ιστών

Μετά την ευθανασία (EU 63, 2010), σε ηλικία 39 ημερών, επιλέχθηκαν τυχαία 7 ορνίθια ανά επέμβαση και μικρά κομμάτια από δείγματα του μέσου δωδεκαδακτύλου, της μέσης νήστιδας, του μέσου ειλεού και των μέσων τυφλών αφαιρέθηκαν προσεκτικά και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε RNA later. Έπειτα από σύντομη παραμονή στους 4°C, στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

6.2.4. Μοριακές αναλύσεις

Τα κομμάτια χωρίς το περιεχόμενο πλύθηκαν σε 4 ml κρύου ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος (PBS)-αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA, 10 mmol/L) διαλύματος (pH = 7,2) και ένα μικρό δείγμα (70-100 mg) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου Eppendorf. Τελικά, το συνολικό RNA από τα τμήματα του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας, του ειλεού και των τυφλών λήφθηκε όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο του κατασκευαστή από τη Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Γερμανία, με το χειρισμό του NucleoZOL Reagent. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA μετρήθηκε με φασματοφωτομετρία με τη χρήση NanoDrop-1000 από την Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ηνωμένο Βασίλειο.

Εφαρμόστηκε πέψη με DNase προκειμένου να αφαιρεθεί το γενωμικό DNA από τα δείγματα RNA. Δέκα µg RNA τοποθετήθηκαν μαζί με 1 U DNase I (M0303, New England Biolabs Inc, Ipswich, Ηνωμένο Βασίλειο) και 10 µL ρυθμιστικού διαλύματος DNase 10x σε τελικό όγκο 100 µl με την προσθήκη νερού DEPC και παρέμειναν για 20 λεπτά στους 37°C. Πριν από την απενεργοποίηση της DNase στους 75 °C για 10 λεπτά, το EDTA προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 mM για να προστατεύσει το RNA από την αποικοδόμηση κατά την απενεργοποίηση του ενζύμου. Η ακεραιότητα του RNA εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Από κάθε δείγμα, 500 ng ολικού RNA μεταγράφηκαν αντίστροφα σε cDNA με το kit αντιδραστηρίων PrimeScript RT (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Shiga-Ken, Ιαπωνία) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Όλα τα cDNA αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια στους -20 °C.

Εξετάστηκαν τα ακόλουθα γονίδια *Gallus gallus*: υποδοχέας αρυλ-υδρογονάνθρακα 1 (*Ahr1*), υποδοχέας αρυλ-υδρογονάνθρακα 2 (*Ahr2*), υποδοχέας μετατόπισης των αρυλ-υδρογονανθράκων στον πυρήνα (*ARNT*), συνθάση της προσταγλανδίνης E3 (*P23*), πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (*XAP2*), κυτόχρωμα P4501A1 (*CYP1A1*), κυτόχρωμα P4501A2 (*CYP1A2*), κυτόχρωμα P4501B1 (*CYP1B1*), μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (*Nrf2*), πρωτεΐνη Keap1 (*Keap1*), δισμουτάση του υπεροξειδίου 1 (*SOD1*), καταλάση (*CAT*), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 2 (*GPX2*), οξυγενάση της αίμης 1 (*HMOX1*), NAD(P)H:οξειδοαναγωγή της κινόνης (*NQO1*), S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GSTA2*), πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (*HSP70*), πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (*HSP90*), toll – like υποδοχέα 2B (*TLR2B*), toll – like υποδοχέα 4 (*TLR4*), μεταγραφικός παράγοντας NFκB1 (*NFκB1*), αναστολέας μεταγραφικού παράγοντα NFκB1 (*IKKα*), παράγοντας νέκρωσης όγκων α (*TNFα*), οκλουδίνη (*OCLN*), ζονούλα οκλουδίνη 1 (*ZO1*), ζονούλα οκλουδίνη 2 (*ZO2*), κλαουδίνη 1 (*CLDN1*), κλαουδίνη 5 (*CLDN5*), βλεννίνη-2 (*MUC2*), αφυδρογονάση τριφωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (*GAPDH*) και ακτίνη βήτα (*ACTB*). Οι κατάλληλοι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες GenBank που υπάρχουν στο Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας και στην Εθνική Βιβλιοθήκη Ιατρικής των ΗΠΑ (NCBI) που φαίνονται στον Πίνακα 6.1. Οι εκκινητές ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Primer Blast για βάσεις δεδομένων mRNA *Gallus gallus* για να διασφαλιστεί ότι υπήρχε ένα μοναδικό αμπλικόνιο. Ο υπολογισμός των σχετικών αναλογιών έκφρασης των γονιδίων-στόχων διεξήχθη σύμφωνα με το (Pfaffl, 2001) και προσαρμόστηκαν με τη διαδικασία κανονικοποίησης πολλαπλών γονιδίων αναφοράς χρησιμοποιώντας τον γεωμετρικό μέσο όρο των γραμμικών σχετικών ποσοτήτων τιμών RQ των 2 γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *ACTB* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με το (Hellemans et al., 2007).

Πίνακας 6.1. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων στόχων με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Αριθμός πρόσβασης GenBank
<i>GAPDH</i>	F: ACTTTGGCATTGTGGAGGGT R: GGACGCTGGGATGATGTTCT	59.5	131	NM_204305.1
<i>ACTB</i>	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAGTGGTACG	60	101	NM_205518.1
<i>AhR</i> μονοπάτι				
<i>AhR1</i>	F: TTTAGTGTGGCAGGTGGATT R: CCTTGTGCCAATGATGCTATTTG	60	200	NM_204118.2
<i>AhR2</i>	F: TGTGACTGCAGATGGCTACAT R: CAGCTCTGTCGTCCTTGTGG	62	122	NM_001319008.1
<i>ARNT</i>	F: GAGACCAAGGCCCAACTAC R: TCGGGTGCCTCTTTCTTTCC	62	140	NM_204200.1
<i>P23</i>	F: ACACCAGGAATCGGCAATGT R: GCCTCCACTCCAAATCAGGG	60	87	NM_205398.1
<i>XAP2</i>	F: GTTTATGGGGAGTCAGCGGAA R: TGGGCTCAGTGTGGAGATCA	60	112	NM_204469.1
<i>CYP1A1</i>	F: GTGATGGAGGTGACCATCGG R: ACATTCGTAGCTGAACGCCA	62	165	NM_205147.1
<i>CYP1A2</i>	F: CTGACCGTACACCACGCTT R: CTCGCCTGCACCATCACTTC	62	75	NM_205146.2
<i>CYP1B1</i>	F: CAGTGACTCCGCATCCCAA R: CCATACGCTTACGGCAGGTT	62	132	XM_015283751.2

Nrf2 μονοπάτι					
<i>Nrf2</i>	F: AGACGCTTTCTTCAGGGGTAG R: AAAAACTTCACGCCTTGCCC	60	285		NM_205117.1
<i>Keap1</i>	F: GGTTACGATGGGACGGATCA R: CACGTAGATCTTGCCCTGGT	62	135		XM_025145847.1
<i>CAT</i>	F: ACCAAGTACTGCAAGGCGAA R: TGAGGGTTCCTCTTCTGGCT	60	245		NM_001031215
<i>SOD1</i>	F: AGGGGGTCATCCACTTCC R: CCCATTTGTGTTGTCTCCAA	60	122		NM_205064.1
<i>GPX2</i>	F: GAGCCCAACTTCACCCTGTT R: CTTCAAGGTAGGCGAAGACGG	62	75		NM_001277854.1
<i>HMOX1</i>	F: ACACCCGCTATTTGGGAGAC R: GAACTTGGTGGCGTTGGAGA	62	134		NM_205344.1
<i>NQO1</i>	F: GAGCGAAGTTCAGCCCAGT R: ATGGCGTGGTTGAAAGAGGT	60.5	150		NM_001277619.1
<i>GSTA2</i>	F: GCCTGACTTCAGTCCTTGGT R: CCACCGAATTGACTCCATCT	60	138		NM_001001776.1
Πρωτεΐνες θερμικού σοκ					
<i>HSP70</i>	F: ATGCTAATGGTATCCTGAACG R: TCCTCTGCTTTGTATTTCTCTG	60	145		NM_001006685.1
<i>HSP90</i>	F: CACGATCGCACTCTGACCAT R: CTGTCACCTTCTCCGCAACA	60	196		NM_001109785.1
NFκB μονοπάτι					
<i>TLR2B</i>	F: CTTGGAGATCAGAGTTTGGGA R: ATTTGGGAATTTGAGTGCTG	62	238		NM_001161650.1
<i>TLR4</i>	F: GTCTCTCCTTCCTTACCTGCTGTT R: AGGAGGAGAAAGACAGGGTAGGTG	64.5	187		NM_001030693.1

<i>NFkB1</i>	F: GAAGGAATCGTACCGGGAACA R: CTCAGAGGGCCTTGTGACAGTAA	59	131	NM_205134.1
<i>IKKa</i>	F: TTCACTGGTAAGCTCCAGCC R: TTCTCTTGCCTCCTGCAACA	60	199	NM_001012904.1
<i>TNFa</i>	F: GAGCAGGGCTGACACGGAT R: GCACAAAAGAGCTGATGGCAG	60	149	NM_204267.1
Ακεραιότητα εντερικού φραγμού				
<i>OCLN</i>	F: TCATCGCCTCCATCGTCTAC R: TCTTACTGCGCGTCTTCTGG	62	240	NM_205128.1
<i>ZO1</i>	F: CTTCAGGTGTTTCTCTTCCTCCTC R: CTGTGGTTTCATGGCTGGATC	59.5	131	XM_413773
<i>ZO2</i>	F: CGGCAGCTATCAGACCACTC R: CACAGACCAGCAAGCCTACAG	59.5	87	NM_204918
<i>CLDN1</i>	F: CTGATTGCTTCCAACCAG R: CAGGTCAAACAGAGGTACAAG	59.5	140	NM_001013611
<i>CLDN5</i>	F: CATCACTTCTCCTTCGTCAGC R: GCACAAAGATCTCCCAGGTC	59.5	111	NM_204201
<i>MUC2</i>	F: GCTGATTGTCACTCACGCCTT R: ATCTGCCTGAATCACAGGTGC	62	442	XM_015274015.1

6.2.5. Στατιστική ανάλυση

Τα πειραματικά δεδομένα ελέγχθηκαν για κανονικότητα χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Kolmogorov Smirnov και διαπιστώθηκε ότι κατανεμήθηκαν κανονικά. Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη γενική διαδικασία παραγοντικής ANOVA χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικών πακέτων SPSS για Windows. Στατιστικώς σημαντικές επιδράσεις αναλύθηκαν περαιτέρω και η σύγκριση των μέσων πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία πολλαπλής σύγκρισης στατιστικά σημαντικής διαφοράς του Tukey. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$.

6.3. Αποτελέσματα

6.3.1. Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Μεταξύ των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων ο ΡΑΣΒ και η ΚΤ διέφεραν σημαντικά ($P < 0.05$) μεταξύ των επεμβάσεων (Πίνακας 6.2). Συγκεκριμένα, τα ορνίθια των επεμβάσεων DON και FUM είχαν σημαντικά χαμηλότερο ($P = 0.002$) ΡΑΣΒ σε σύγκριση με τα ορνίθια της επέμβασης δίαιτας DS. Επιπλέον, η προσθήκη FUM μείωσε σημαντικά την ΚΤ ($P = 0.018$) κατά τη διάρκεια ολόκληρου του πειράματος σε σύγκριση με την επέμβαση DS (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2. Παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων (1-39 μέρες).

Δεδομένα ¹	Επεμβάσεις ²			SEM ³	<i>p-value</i> ⁴
	DS ²	DON	FUM		
ΡΑΣΒ	1965.6^B	1827.1^A	1816.7^A	38.14	0.002
ΚΤ	3387.2^B	3351.8^{AB}	3183.9^A	68.06	0.018
ΣΕΤ	1.73	1.83	1.75	0.042	0.054

¹ Ρυθμός αύξησης σωματικού βάρους (ΡΑΣΒ), κατανάλωση τροφής (ΚΤ) και συντελεστής εκμετάλλευσης τροφής (ΣΕΤ). Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από $n=7$ επαναλήψεις ανά επέμβαση.

² Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυριβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

³ Τυπικό σφάλμα μέσων.

⁴ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

6.3.2. Έκφραση γονιδίων σε όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα

Στο δωδεκαδάκτυλο, τα επίπεδα σχετικής γονιδιακής έκφρασης του μονοπατιού AhR (*AhR1*, *AhR2*, *ARNT*, *P23*, *XAP2*, *CYP1A1*, *CYP1A2* και *CYP1B1*), του μονοπατιού Nrf2 (*Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD*, *GPX2*, *HMOX1*, *GSTA2*) τα γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση στη θερμότητα (*HSP70* και *HSP90*) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3**. Η προσθήκη της δεοξυριβαλενόλης αύξησε σημαντικά ($P < 0.05$) τη σχετική γονιδιακή έκφραση του *AhR1* ($P = 0.005$), του *AhR2* ($P = 0.038$) και του *CYP1B1* ($P = 0.041$) σε σύγκριση με τα ορνίθια κρεοπαραγωγής της επέμβασης DS. Επιπλέον, η επέμβαση DON έδειξε σημαντικά υψηλότερες τιμές *NQO1* ($P = 0.008$) σε σύγκριση με τη FUM. Επιπλέον, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του *HSP90* αυξήθηκαν σημαντικά ($P=0.020$) από την προσθήκη της δεοξυριβαλενόλης σε σύγκριση με την προσθήκη φουμονισινών. Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση FUM αύξησε σημαντικά ($P=0.010$) τα επίπεδα έκφρασης του *HSP70* στο δωδεκαδάκτυλο σε σύγκριση με την επέμβαση DS (**Πίνακας 6.3**).

Πίνακας 6.3. Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR) (*AhR1*, *AhR2*, *ARNT*, *P23*, *XAP2*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*), γονίδια μονοπατιού Nrf2 (*Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD*, *GPX2*, *HMOX1*, *NQO1*, *GSTA2*) και γονίδια θερμικού σοκ (*HSP70*, *HSP90*) στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 39 ημερών.

Δωδεκαδάκτυλος	Επεμβάσεις ¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM ²	<i>p</i> -value ³
AhR μονοπάτι					
<i>AhR1</i>	0.66^A	2.91^B	1.21^{AB}	0.478	0.005
<i>AhR2</i>	1.14^A	2.33^B	1.27^{AB}	0.463	0.038
<i>ARNT</i>	1.48	2.29	1.91	0.679	0.498
<i>P23</i>	1.09	2.05	1.64	0.586	0.286
<i>XAP2</i>	0.83	1.70	1.18	0.537	0.287
<i>CYP1A1</i>	1.58	1.60	2.53	0.737	0.358
<i>CYP1A2</i>	1.06	1.63	1.05	0.471	0.390
<i>CYP1B1</i>	1.08^A	2.21^B	1.28^{AB}	0.436	0.041
Nrf2 μονοπάτι					
<i>Nrf2</i>	1.02	0.98	1.04	0.201	0.956
<i>Keap1</i>	0.92	1.24	1.64	0.323	0.097
<i>CAT</i>	1.34	1.14	0.96	0.229	0.269
<i>SOD</i>	1.08	1.37	1.01	0.200	0.198
<i>GPX2</i>	1.15	1.12	1.06	0.243	0.939
<i>HMOX1</i>	1.15	1.02	0.95	0.212	0.633
<i>NQO1</i>	1.74^{AB}	1.90^B	0.89^A	0.341	0.018
<i>GSTA2</i>	1.01	1.49	0.64	0.349	0.078
Γονίδια θερμικού σοκ					
<i>HSP70</i>	0.74^A	1.28^{AB}	1.99^B	0.362	0.010
<i>HSP90</i>	1.50^{AB}	3.04^B	1.07^A	0.493	0.020

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι NF-κB (*TLR2B*, *TLR4*, *NFκB1*, *IKKα* και *TNFα*) και η ακεραιότητα του φραγμού του εντέρου (*OCLN*, *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5* και *MUC2*) στο δωδεκαδάκτυλο παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4. Η επέμβαση DON έδειξε σημαντικά ($P = 0.035$) υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *NFκB1*, σε σύγκριση με την επέμβαση DS. Επιπλέον, η έκφραση *MUC2* στο δωδεκαδάκτυλο μειώθηκε σημαντικά ($P = 0.019$) στη DON σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα. Από την άλλη πλευρά, η FUM αύξησε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του *TLR4* σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα. Τέλος, τα ορνίθια κρεοπαραγωγής με προσθήκη φουμονισινών στον δωδεκαδάκτυλο εμφάνισαν σημαντικά ($P = 0.035$) υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *NF-κB*, σε σύγκριση με αυτά της επέμβασης του μάρτυρα (Πίνακας 6.4).

Πίνακας 6.4. Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB (*TLR2B*, *TLR4*, *NF-κB*, *IKKa*, *TNFa*) και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού (*OCLN*, *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *MUC2*) στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 39 ημερών.

<i>Δωδεκαδάκτυλος</i>	Επεμβάσεις¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM²	p-value³
<i>NFκB1</i> μονοπάτι					
<i>TLR2B</i>	1.33	2.07	1.62	0.674	0.547
<i>TLR4</i>	0.68^A	1.54^{AB}	1.72^B	0.548	0.005
<i>NFκB1</i>	0.84^A	1.10^B	1.10^B	0.107	0.035
<i>IKKa</i>	1.58	1.83	1.06	0.245	0.143
<i>TNFa</i>	1.67	1.90	1.27	0.519	0.490
Ακεραιότητα εντερικού φραγμού					
<i>OCLN</i>	1.04	1.07	1.08	0.181	0.975
<i>ZO1</i>	0.95	0.90	1.04	0.140	0.589
<i>ZO2</i>	0.93	1.01	0.99	0.077	0.586
<i>CLDN1</i>	1.09	0.79	0.91	0.193	0.303
<i>CLDN5</i>	0.97	0.76	1.02	0.248	0.539
<i>MUC2</i>	1.68^B	0.93^A	1.02^{AB}	0.330	0.019

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Στη νήστιδα, η προσθήκη δεοξυνιβαλενόλης προκάλεσε σημαντική αύξηση ($P = 0.037$) στα επίπεδα έκφρασης του *CYP1A1* σε σύγκριση με τη DS. Από την άλλη πλευρά, τα ορνίθια κρεοπαραγωγής που τρέφονται με φουμονισίνες έδειξαν σημαντικά ($P = 0.021$) χαμηλότερα επίπεδα *GSTA2* σε σύγκριση με εκείνα της επέμβασης DS (**Πίνακας 6.5**).

Πίνακας 6.5. Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR) (*AhR1*, *AhR2*, *ARNT*, *P23*, *XAP2*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*), γονίδια μονοπατιού Nrf2 (*Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD*, *GPX2*, *HMOX1*, *NQO1*, *GSTA2*) και γονίδια θερμικού σοκ (*HSP70*, *HSP90*) στη νήσιδα ορνιθίων 39 ημερών.

<i>Νήσιδα</i>	Επεμβάσεις ¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM ²	<i>p-value</i> ³
<i>AhR</i> μονοπάτι					
<i>AhR1</i>	1.40	2.31	1.45	0.809	0.466
<i>AhR2</i>	1.41	1.61	1.27	0.395	0.696
<i>ARNT</i>	1.73	2.76	2.15	0.755	0.408
<i>P23</i>	1.21	2.54	1.68	0.782	0.253
<i>XAP2</i>	0.86	0.91	1.74	0.480	0.363
<i>CYP1A1</i>	0.71^A	3.23^B	1.71^{AB}	0.895	0.037
<i>CYP1A2</i>	1.25	4.48	1.31	1.076	0.086
<i>CYP1B1</i>	1.41	2.88	1.32	0.908	0.186
<i>Nrf2</i> μονοπάτι					
<i>Nrf2</i>	1.07	0.89	0.90	0.232	0.687
<i>Keap1</i>	0.70	1.48	1.68	0.420	0.073
<i>CAT</i>	1.07	1.38	1.03	0.352	0.695
<i>SOD</i>	0.88	1.15	0.86	0.188	0.252
<i>GPX2</i>	1.46	1.19	0.74	0.325	0.110
<i>HMOX1</i>	0.97	1.24	0.99	0.291	0.599
<i>NQO1</i>	1.76	1.71	0.82	0.479	0.117
<i>GSTA2</i>	1.96^B	1.77^{AB}	0.62^A	0.470	0.021
Γονίδια θερμικού σοκ					
<i>HSP70</i>	0.77	1.41	1.46	0.401	0.189
<i>HSP90</i>	1.48	2.57	1.18	0.879	0.276

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Επιπλέον, στη νήστιδα το *MUC2* είχε σημαντικά ($P = 0.028$) χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στην FUM από ότι στην DS. Όλα τα άλλα γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι NFκB1 και την ακεραιότητα του εντέρου δεν διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) μεταξύ των επεμβάσεων (Πίνακας 6.6).

Πίνακας 6.6. Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB (*TLR2B*, *TLR4*, *NF-κB*, *IKKa*, *TNFa*) και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού (*OCLN*, *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *MUC2*) στη νήστιδα ορνιθίων 39 ημερών.

<i>Νήστιδα</i>	Επεμβάσεις¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM²	<i>p-value</i>³
<i>NFκB1</i> μονοπάτι					
<i>TLR2B</i>	0.92	1.29	1.49	0.637	0.667
<i>TLR4</i>	1.20	1.37	1.28	0.472	0.939
<i>NFκB1</i>	0.76	1.27	1.65	0.366	0.079
<i>IKKa</i>	1.49	1.89	1.38	0.590	0.665
<i>TNFa</i>	1.58	2.55	1.40	0.721	0.258
Ακεραιότητα εντερικού φραγμού					
<i>OCLN</i>	0.96	0.99	1.04	0.184	0.915
<i>ZO1</i>	1.04	1.02	0.92	0.157	0.737
<i>ZO2</i>	1.02	1.10	0.94	0.204	0.742
<i>CLDN1</i>	1.08	0.92	0.88	0.204	0.592
<i>CLDN5</i>	1.33	1.04	0.95	0.190	0.131
<i>MUC2</i>	1.96^B	0.94^{AB}	0.83^A	0.382	0.028

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Στον ειλεό, οι επιδράσεις των DON και FUM στα σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τα μονοπάτια AhR, Nrf2 και την απόκριση στο θερμικό σοκ παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.7. Ειδικότερα, η προσθήκη δεοξινιβαλενόλης αύξησε σημαντικά την έκφραση των *ARNT* ($P = 0.029$) και *XAP2* ($P = 0.018$) σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα. Επιπλέον, η DON αύξησε σημαντικά τα *Keap1* ($P = 0.026$) και *HSP90* ($P = 0.011$) σε σύγκριση με την DS. Αντίθετα, η DON μείωσε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης *GPX2* ($P = 0.042$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Επίσης, η έκφραση του *CYP1A2* ήταν σημαντικά ($P=0.036$) αυξημένη στην FUM σε σύγκριση με την DS. Επιπροσθέτως, η FUM έδειξε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης *GPX2* ($P = 0.042$) από ότι η DS (Πίνακας 6.7).

Πίνακας 6.7. Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR) (*AhR1*, *AhR2*, *ARNT*, *P23*, *XAP2*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*), γονίδια μονοπατιού Nrf2 (*Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD*, *GPX2*, *HMOX1*, *NQO1*, *GSTA2*) και γονίδια θερμικού σοκ (*HSP70*, *HSP90*) στον ειλέο ορνιθίων 39 ημερών.

Ειλέος	Επεμβάσεις ¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM ²	<i>p</i> -value ³
AhR μονοπάτι					
<i>AhR1</i>	1.33	1.48	0.82	0.492	0.387
<i>AhR2</i>	1.67	1.79	1.29	0.647	0.731
<i>ARNT</i>	0.92^A	2.67^B	1.37^{AB}	0.619	0.029
<i>P23</i>	1.02	1.80	1.36	0.355	0.071
<i>XAP2</i>	0.77^A	2.35^B	1.20^{AB}	0.399	0.018
<i>CYP1A1</i>	0.76	1.43	1.24	0.388	0.229
<i>CYP1A2</i>	0.87^A	1.20^{AB}	1.83^B	0.342	0.036
<i>CYP1B1</i>	1.13	1.68	1.31	0.363	0.327
Nrf2 μονοπάτι					
<i>Nrf2</i>	0.87	0.98	0.95	0.190	0.837
<i>Keap1</i>	0.70^A	1.48^B	1.42^{AB}	0.289	0.026
<i>CAT</i>	1.28	1.01	0.92	0.216	0.243
<i>SOD</i>	1.17	1.12	0.95	0.207	0.565
<i>GPX2</i>	1.16^B	0.85^A	0.88^A	0.125	0.042
<i>HMOX1</i>	1.03	1.00	1.13	0.161	0.713
<i>NQO1</i>	1.68	1.50	1.03	0.371	0.225
<i>GSTA2</i>	1.85	1.40	1.10	0.437	0.244
Γονίδια θερμικού σοκ					
<i>HSP70</i>	1.11	1.60	1.19	0.502	0.589
<i>HSP90</i>	0.85^A	2.32^B	1.22^{AB}	0.451	0.011

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι NFκB1 και τα γονίδια που σχετίζονται με την ακεραιότητα του φραγμού του εντέρου στον ειλέο φαίνονται στον Πίνακα 6.8. Τα επίπεδα έκφρασης του *NFκB1* ήταν σημαντικά ($P = 0.018$) υψηλότερα στην επέμβαση DON σε σύγκριση με την FUM. Επιπλέον, οι επεμβάσεις DON και FUM μείωσαν σημαντικά ($P = 0.002$) τα επίπεδα έκφρασης του *CLDN1* σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Πίνακας 6.8).

Πίνακας 6.8. Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB (*TLR2B*, *TLR4*, *NF-κB*, *IKKa*, *TNFa*) και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού (*OCLN*, *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *MUC2*) στον ειλέο ορνιθίων 39 ημερών.

<i>Ειλέος</i>	Επεμβάσεις¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM²	p-value³
NFκB1 μονοπάτι					
<i>TLR2B</i>	1.16	1.19	1.44	0.410	0.762
<i>TLR4</i>	1.26	1.22	1.20	0.253	0.966
<i>NFκB1</i>	1.08^{AB}	1.33^B	0.87^A	0.147	0.018
<i>IKKa</i>	1.34	1.05	1.31	0.396	0.723
<i>TNFa</i>	1.18	0.98	1.73	0.536	0.371
Ακεραιότητα εντερικού φραγμού					
<i>OCLN</i>	1.32	0.79	1.02	0.229	0.097
<i>ZO1</i>	1.19	1.09	0.88	0.140	0.115
<i>ZO2</i>	1.22	1.00	0.76	0.189	0.078
<i>CLDN1</i>	1.65^B	0.72^A	0.57^A	0.192	0.002
<i>CLDN5</i>	0.95	0.95	0.67	0.170	0.188
<i>MUC2</i>	1.17	0.99	1.27	0.292	0.635

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Στα τυφλά, τα επίπεδα έκφρασης των μονοπατιών AhR και Nrf2 και των γονιδίων απόκρισης θερμικού σοκ παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.9. Η προσθήκη δεοξινιβαλενόλης αύξησε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του *Nrf2* ($P = 0.035$) και του *Keap1* ($P = 0.020$), σε σύγκριση με τις επεμβάσεις DS και FUM. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του *HSP90* ήταν σημαντικά ($P = 0.021$) υψηλότερα στην επέμβαση DON από ότι στην DS. Από την άλλη πλευρά, οι φουμονισίνες αύξησαν σημαντικά ($P = 0.010$) τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *CYP1A2* σε σύγκριση με τη DS. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης *Keap1* ήταν σημαντικά ($P = 0.020$) υψηλότερα στην επέμβαση FUM από ότι στην επέμβαση του μάρτυρα. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης *NQO1* ήταν σημαντικά ($P = 0.010$) μειωμένα στην επέμβαση FUM σε σύγκριση με την DS. Τέλος, στα τυφλά το *HSP70* αυξήθηκε σημαντικά ($P = 0.011$) με την προσθήκη των φουμονισινών (Πίνακας 6.9).

Πίνακας 6.9. Σχετική γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του υποδοχέα αρυλ-υδρογονάνθρακα (AhR) (*AhR1*, *AhR2*, *ARNT*, *P23*, *XAP2*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*), γονίδια μονοπατιού Nrf2 (*Nrf2*, *Keap1*, *CAT*, *SOD*, *GPX2*, *HMOX1*, *NQO1*, *GSTA2*) και γονίδια θερμικού σοκ (*HSP70*, *HSP90*) στα τυφλά ορνιθίων 39 ημερών.

<i>Τυφλά</i>	Επεμβάσεις ¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM²	<i>p-value</i>³
<i>Ahr</i> μονοπάτι					
<i>AhR1</i>	1.65	2.65	1.46	0.786	0.291
<i>AhR2</i>	1.38	1.91	1.02	0.489	0.214
<i>ARNT</i>	1.92	3.71	2.27	0.941	0.160
<i>P23</i>	1.23	1.51	1.01	0.230	0.122
<i>XAP2</i>	1.05	1.84	1.14	0.375	0.099
<i>CYP1A1</i>	1.25	1.68	0.93	0.562	0.425
<i>CYP1A2</i>	0.89^A	1.31^{AB}	2.09^B	0.355	0.010
<i>CYP1B1</i>	1.18	1.60	1.16	0.391	0.461
Nrf2 μονοπάτι					
<i>Nrf2</i>	0.96^{AB}	1.26^B	0.63^A	0.221	0.035
<i>Keap1</i>	0.85^A	1.53^B	1.56^B	0.255	0.020
<i>CAT</i>	1.19	0.99	0.72	0.265	0.230
<i>SOD</i>	1.08	1.09	1.00	0.210	0.898
<i>GPX2</i>	0.94	1.11	1.15	0.248	0.685
<i>HMOX1</i>	1.11	0.94	0.93	0.178	0.516
<i>NQO1</i>	1.65^B	1.33^{AB}	0.69^A	0.347	0.038
<i>GSTA2</i>	1.72	1.15	0.81	0.386	0.084
Πρωτεΐνες θερμικού σοκ					
<i>HSP70</i>	0.78^A	0.99^{AB}	1.29^B	0.151	0.011
<i>HSP90</i>	1.08^A	2.45^B	1.18^A	0.494	0.021

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι NFκB1 και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ($P < 0.05$) ούτε από την DON ούτε από την FUM (Πίνακας 6.10) στα τυφλά ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Πίνακας 6.10. Σχετική γονιδιακή έκφραση του μονοπατιού NF-κB (*TLR2B*, *TLR4*, *NF-κB*, *IKKa*, *TNFa*) και γονιδίων ακεραιότητας εντερικού φραγμού (*OCLN*, *ZO1*, *ZO2*, *CLDN1*, *CLDN5*, *MUC2*) στα τυφλά ορνιθίων 39 ημερών.

<i>Τυφλά</i>	Επεμβάσεις¹			Στατιστική ανάλυση	
	DS	DON	FUM	SEM²	p-value³
NFκB1 μονοπάτι					
<i>TLR2B</i>	1.45	1.15	1.65	0.496	0.607
<i>TLR4</i>	0.84	1.22	1.31	0.283	0.064
<i>NFκB1</i>	0.88	1.16	1.07	0.142	0.152
<i>IKKa</i>	1.03	2.27	1.18	0.612	0.112
<i>TNFa</i>	1.91	1.74	1.14	0.610	0.434
Ακεραιότητα εντερικού φραγμού					
<i>OCLN</i>	1.41	1.29	0.66	0.343	0.089
<i>ZO1</i>	0.98	1.13	1.02	0.173	0.673
<i>ZO2</i>	1.32	0.89	1.07	0.271	0.303
<i>CLDN1</i>	1.07	1.13	0.78	0.240	0.325
<i>CLDN5</i>	0.94	0.76	0.92	0.119	0.285
<i>MUC2</i>	0.95	1.31	0.44	0.346	0.065

¹ Σιτηρέσιο πρόκλησης δυσβίωσης (DS) χωρίς προσθήκη μυκοτοξινών που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, DS με δεοξυνιβαλενόλη (DON) στα 5 mg / kg σιτηρεσίου και DS με φουμονισίνη (FUM) στα 20 mg / kg σιτηρεσίου.

² Τυπικό σφάλμα μέσων.

³ Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B) στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για $P \leq 0.05$

6.4. Συζήτηση-Σχολιασμός

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες από μύκητες που βρίσκονται συνήθως ως μολυσματικές ουσίες σε ζωοτροφές. Οι μυκοτοξίνες έχουν αρνητικό αντίκτυπο, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στις ζωοτροφές, στην υγεία και την παραγωγικότητα των ορνιθίων κρεατοπαραγωγής, με αποτέλεσμα σημαντικές οικονομικές απώλειες (Grenier et al., 2016; Liu et al., 2020a). Επιπλέον, η χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα μυκοτοξινών, συμπεριλαμβανομένων του κρέατος και του ήπατος, δημιουργεί ανησυχία για την ασφάλεια των ανθρώπων που καταναλώνουν αυτά τα προϊόντα (Ochieng et al., 2021). Οι πιο σημαντικές μυκοτοξίνες στην παραγωγή ορνιθίων είναι αυτές που παράγονται από τα είδη μυκήτων *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* (Liu et al., 2020a). Στα ορνίθια, δύο από τις πιο συχνές μυκοτοξίνες των δημητριακών είναι η δεοξυνιβαλενόλη και οι φουμονισίνες που παράγονται από μύκητες *Fusarium* (Antonissen et al., 2014).

Η παρουσία δεοξυνιβαλενόλης και φουμονισινών ακόμη και σε συγκεντρώσεις κοντά στους περιορισμούς της ΕΕ (5 και 20 mg/kg σιτηρεσίου, αντίστοιχα), θα μπορούσε να έχει (Antonissen et al., 2014; Grenier et al., 2016) ή όχι (Grenier et al., 2016; Song et al., 2018; Riahi et al., 2020) επιβλαβείς επιδράσεις στην κατάσταση της υγείας του εντέρου και της παραγωγικότητας των ορνιθίων. Αυτό πιθανόν συμβαίνει γιατί τα ορνίθια τα τελευταία χρόνια είναι υψιπαραγωγά ζώα λόγω της ανάγκης των ανθρώπων για μεγαλύτερη κατανάλωση λευκού κρέατος. Έτσι, προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η δεοξυνιβαλενόλη ή οι φουμονισίνες σε συγκεντρώσεις κοντά ή χαμηλότερες από τους περιορισμούς της ΕΕ στα σιτηρέσια ορνιθίων κρεοπαραγωγής, επηρέασαν αρνητικά την εντερική υγεία και λειτουργία και ως εκ τούτου τις παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων (Yunus et al., 2012; Lucke et al., 2018; Santos and van Eerden, 2021). Επίσης, η δεοξυνιβαλενόλη και οι φουμονισίνες σε συνδυασμό, έχουν επηρεάσει αρνητικά την υγεία του εντέρου και την αύξηση του σωματικού βάρους των ορνιθίων (Grenier et al., 2016; Liu et al., 2020a). Τα παραγωγικά αποτελέσματα για την ΔΔ έδειξαν ότι τόσο η DON όσο και η FUM μείωσαν σημαντικά το ΡΑΣΒ των ορνιθίων.

Πιθανή εξήγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων θα μπορούσε να δοθεί μελετώντας τους μηχανισμούς πίσω από τις επιβλαβείς επιδράσεις της DON και των FUM στην υγεία του εντέρου, προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα ποια μεταβολικά

μονοπάτια εμπλέκονται σε ένα εντερικό τμήμα, με συγκεκριμένο τρόπο. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη αξιολόγησε μια παλέτα μοριακών βιοδεικτών που σχετίζονται με τα πιο κρίσιμα μεταβολικά μονοπάτια για την εντερική αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, το στρες, την φλεγμονώδη απόκριση και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού, κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων.

Στην παρούσα μελέτη, δημιουργήθηκε δυσβιωτικό σιτηρέσιο (DS) ως ένας επιπλέον παράγοντας στρεσογόνος κατάστασης. Ειδικότερα, τα σιτηρέσια με αυξημένα επίπεδα πολυσακχαριτών χωρίς άμυλο (NSP), είναι γνωστό ότι επηρεάζουν αρνητικά την απόδοση της ανάπτυξης των ορνιθίων κρεοπαραγωγής στην πεπτικότητα των θρεπτικών ουσιών, τη λειτουργία και την οικολογία του εντέρου (Teirlinck et al., 2009; Paraskeuas and Mountzouris, 2019a; Santos and van Eerden, 2021). Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαίωσαν τον αρνητικό αντίκτυπο του σιτηρεσίου DS στην απόδοση. Ειδικότερα, τα συνολικά ΡΑΣΒ, ΚΤ και ΣΕΤ των ορνιθίων κρεοπαραγωγής μειώθηκαν από τα σιτηρέσια DS, κατά 30%, 22% και 11%, σε σύγκριση με τους στόχους απόδοσης των αρσενικών Ross 308 ηλικίας 39 ημερών, αντίστοιχα.

Ο έλεγχος του οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητος για την υγεία και την απόδοση του εντέρου των ορνιθίων. Τα εντεροκύτταρα των ορνιθίων μπορούν να αντισταθούν στο οξειδωτικό στρες μέσω μηχανισμών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση των κυτταροπροστατευτικών ενζύμων με αποτοξινωτικές και αντιοξειδωτικές λειτουργίες (Köhle and Bock, 2006; Huang et al., 2015). Το μονοπάτι του υποδοχέα υδρογονάνθρακα αρυλίου (AhR) σχετίζεται με την αποτοξίνωση ξеноβιοτικών ενώσεων όπως οι μυκοτοξίνες. Στην παρούσα μελέτη, η DON, επηρέασε κυρίως τους μηχανισμούς εντερικής αποτοξίνωσης στο δωδεκαδάκτυλο και στον ειλέο των ορνιθίων. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *AhR1*, *AhR2* και *CYP1B1* στο δωδεκαδάκτυλο και τα *ARNT* και *XAP2* στον ειλέο, αυξήθηκαν με την κατανάλωση DON. Από την άλλη πλευρά, σε σύγκριση με τη DON, η FUM είχε μικρότερη και διαφορετική επίδραση στα γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι AhR αυξάνοντας την έκφραση του *CYP1A2* στον ειλέο και τα τυφλά. Στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, οι επιδράσεις των μυκοτοξινών στα γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι σηματοδότησης AhR έχουν διερευνηθεί από περιορισμένο αριθμό μελετών. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων AhRs και CYPs αυξήθηκαν με την κατανάλωση της αφλατοξίνης (Muhammad et al., 2017; Ates and Ortatlatli, 2021) και της τοξίνης T-2 (Liu et al., 2019b) στο ήπαρ ορνιθίων. Ωστόσο, υπάρχουν λίγες

πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών στα γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολικό μονοπάτι AhR κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων (Antonissen et al., 2017).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 είναι ο βασικός ρυθμιστής της αντιοξειδωτικής απόκρισης και του ξενοβιοτικού μεταβολισμού των εντερικών κυττάρων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Vomund et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας μοριακή προσέγγιση, η DON και η FUM μείωσαν την αντιοξειδωτική απόκριση στο έντερο. Συγκεκριμένα, η παρουσία DON στο όριο της ΕΕ αύξησε τον *Keap1* (αναστολέα του Nrf2), σε επίπεδο ειλεού και τυφλών και μείωσε τη γονιδιακή έκφραση του αντιοξειδωτικού γονιδίου *GPX2*. Επιπλέον, η FUM μείωσε τη γονιδιακή έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων *GSTA2* στη νήστιδα, της *GPX2* στον ειλέο και του *NQO1* στα τυφλά ενώ αύξησε το *Keap1* στα τυφλά. Επίσης, αποδεικνύεται εξάρτηση του εντερικού τμήματος με τις επιδράσεις DON και FUM σε γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι Nrf2 το οποίο θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγηθεί από διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εντερικού τμήματος (Cheng et al., 2018). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει βιοχημικά ότι η χορήγηση χαμηλών επιπέδων μυκοτοξινών *Fusarium* κοντά στα όρια της ΕΕ αύξησε την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Awad et al., 2012; Jiang et al., 2014; Cheng et al., 2018; Sousa et al., 2020) και μείωσε τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Jiang et al., 2014; Cheng et al., 2018; Sousa et al., 2020) με αποτέλεσμα να διακυβεύεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των ορνιθίων.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) όπως οι HSP70 και HSP90 εκφράζονται ως απόκριση σε παράγοντες στρες όπως περιβαλλοντικές συνθήκες, τοξικές επιδράσεις ξενοβιοτικών, οξειδωτικό στρες και φλεγμονώδη απόκριση (El Gollı Bennour et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, η DON αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του HSP90 στον ειλέο και στα τυφλά. Επιπλέον, η προσθήκη FUM αύξησε τα επίπεδα έκφρασης της HSP70 στη νήστιδα και στα τυφλά όπως οι μυκοτοξίνες *Fusarium* τυφλού αύξησαν την HSP70 σε ιστούς σπλήνας (Shang et al., 2016) και ήπατος (Jiang et al., 2014) ορνιθίων 42 ημερών. Επομένως, η DON και η FUM σε αυτή τη μελέτη αύξησαν τα HSPs και αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να υποδεικνύει ότι ακόμη και στα όρια της ΕΕ, αυτές οι μυκοτοξίνες δρουν ως στρεσογόνοι παράγοντες στα εντερικά κύτταρα.

Παράλληλα, προκειμένου να αξιολογηθούν οι επιδράσεις της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών στη φλεγμονώδη απόκριση, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NFκB1. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η DON και η FUM προκάλεσαν φλεγμονώδη απόκριση κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο. Συγκεκριμένα, η DON αύξησε την έκφραση του *NFκB1* και η FUM αύξησε τα επίπεδα έκφρασης τόσο του *NFκB1* όσο και του *TLR4* στο δωδεκαδάκτυλο. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά τα ευρήματα είχαν αρκετές μελέτες που έχουν δείξει ότι οι μυκοτοξίνες *Fusarium* που περιλαμβάνονται σε συγκεντρώσεις κοντά στους περιορισμούς της ΕΕ αυξάνουν τα TLRs (Lucke et al., 2018; Guo et al., 2021) και τις προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Grenier et al., 2016, 2017; Lucke et al., 2018; Guo et al., 2021) στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Το εντερικό επιθηλιακό στρώμα είναι ένας επιλεκτικός φραγμός που αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα και πρωτεΐνες στενού συνδέσμου (TJs) και επιτρέπει την είσοδο θρεπτικών ουσιών (Antonissen et al., 2014). Οι μυκοτοξίνες *Fusarium* και οι μεταβολίτες τους δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος και ως αποτέλεσμα έχουν αρνητικό αντίκτυπο στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Lucke et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, στο δωδεκαδάκτυλο, η DON μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του *MUC2* και του *CLDN1* στον ειλεό. Ομοίως, οι μυκοτοξίνες *Fusarium* που προστέθηκαν σε επίπεδα κοντά στα όρια της ΕΕ μείωσαν τα επίπεδα έκφρασης των *MUC2* (Cheng et al., 2018; Azizi et al., 2021), *ZOI* (Cheng et al., 2018), στη νήστιδα ορνιθίων 42 ημερών. Επιπλέον, η FUM μείωσε το *MUC2* στη νήστιδα και το *CLDN1* στον ειλεό. Γενικά, φαίνεται ότι τα επίπεδα της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών στα όρια της ΕΕ έχουν περιορισμένες επιδράσεις στα TJ κυρίως στον ειλεό, ενώ η μείωση της *MUC2* έγινε κυρίως από την επέμβαση DON. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να έχουν να κάνουν με τις θέσεις απορρόφησης της μυκοτοξίνης και χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα.

Συμπερασματικά, μια ισχυρή παλέτα μοριακών βιοδεικτών κρίσιμης σημασίας για την εντερική αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, το στρες, την φλεγμονώδη απόκριση και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού, διαλεύκανε τους άγνωστους μηχανισμούς δράσης των μυκοτοξινών που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, αυξήθηκαν οι διαδικασίες της εντερικής αποτοξίνωσης (μονοπάτι AhR) και μειώθηκε η αντιοξειδωτική απόκριση (μονοπάτι Nrf2) με την προσθήκη των μυκοτοξινών. Η

μείωση της αντιοξειδωτικής απόκρισης θα μπορούσε να έχει ως συνέπεια διάφορες ελλείψεις και στον έλεγχο της φλεγμονής, γεγονός που επιβεβαιώνεται με την ενεργοποίηση των HSPs και της αύξησης των βιοδεικτών της φλεγμονής (π.χ. *NF-kB*). Από τις δύο μυκοτοξίνες που μελετήθηκαν, η δεοξυνιβαλενόλη είχε ισχυρότερο αποτέλεσμα σε σύγκριση με τις φουμονισίνες. Η γνώση που δημιουργήθηκε από την παρούσα μελέτη μπορεί να προσφέρει μοριακά χρήσιμα εργαλεία για την αξιολόγηση της εντερικής υγείας και λειτουργίας με σκοπό την προστασία από τις μυκοτοξίνες.

7. Κεφάλαιο 7-Σχολιασμός/Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς δράσης στοχευμένων διατροφικών αλλαγών στον εντερικό σωλήνα κρεοπαραγωγών ορνιθίων μελετώντας μια σειρά επιλεγμένων εντερικών μοριακών βιοδεικτών, εμπλεκόμενων σε σημαντικά μοριακά μονοπάτια για την εντερική ακεραιότητα, λειτουργία και υγεία, παρακολουθώντας παράλληλα και τις παραγωγικές τους αποδόσεις. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε ένα τυποποιημένο ΦΒΣ (ΦΒΣ1) σε σιτηρέσια που διέφεραν ως προς το επίπεδο ΜΕ και ΟΠ (μελέτη 1 και 2) καθώς και ένα δύσπεπτο - δυσβιωτικό σιτηρέσιο με την παρουσία μυκοτοξινών όπως η δεοξινιβαλενόλη (DON) και οι φουμονισίνες (FUM) (μελέτη 3).

Στις μελέτες 1 και 2 το ΦΒΣ που χρησιμοποιήθηκε είχε ως βασικό συστατικό την καρβακρόλη. Οι επιδράσεις των ΦΒΣ γενικά στην διατροφή των ορνιθίων έχει διερευνηθεί αρκετά σε προηγούμενες μελέτες (Mountzouris et al., 2011, 2019, 2020; Paraskeuas et al., 2017a; b; Paraskeuas and Mountzouris, 2019a; b) με τις περισσότερες να παρουσιάζουν ευεργετικά αποτελέσματα στα παραγωγικά χαρακτηριστικά, στις βιοχημικές παραμέτρους στο αίμα και στο κρέας καθώς και στην ποιότητα του κρέατος. Λίγες από αυτές εμβάθυναν στους μηχανισμούς δράσης των ΦΒΣ για την ολοκληρωμένη κατανόησή τους. Έτσι προέκυψε η ανάγκη διερεύνησης μοριακών μονοπατιών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική απόκριση και την εντερική υγεία. Οι επιδράσεις της προσθήκης ΦΒΣ επί των παραγωγικών αποδόσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των TJs με τη μέτρηση μοριακών και βιοχημικών βιοδεικτών διερευνήθηκαν σε συνδυασμό με μειωμένα 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 έκφρασης κρίσιμων γονιδιακών βιοδείκτες των μονοπατιών που ρυθμίζουν τον έλεγχο της φλεγμονής (μονοπάτι TLR), την κυτταρική απόπτωση (μονοπάτι MAPK) και τον μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών (μονοπάτι PI3KCA/Akt/mTOR) κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου των ορνιθίων (2^η μελέτη).

Επιπρόσθετα, στην παρούσα ΔΔ μελετήθηκε και η δράση των μυκοτοξινών DON και FUM. Κύριος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της προσθήκης κάποιων ξενοβιοτικών στον οργανισμό (μυκοτοξίνες) στον πεπτικό

σωλήνα κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την ενδεδειγμένη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μοριακών βιοδεικτών που σχετίζονται με την αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, το στρες, τη φλεγμονή και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού κατά μήκος του εντέρου των ορνιθίων (3^η μελέτη).

Στην 1^η μελέτη, η ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ χειροτέρεψε τον συνολικό ΡΑΣΒ και τον ΣΕΤ. Σε αυτή τη μελέτη επίσης, ο ΡΑΣΒ και ο ΣΕΤ βελτιώθηκαν σε ορνίθια που έλαβαν ΦΒΣ, ειδικά στην περίπτωση του σιτηρεσίου Η, ενώ τα ορνίθια της επέμβασης L+ ήταν καλύτερα σε σύγκριση με την επέμβαση L-. Επιπρόσθετα, οι χαμηλές προδιαγραφές σιτηρεσίου αύξησαν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική απόκριση (δηλαδή, *Kear1*, *GPX2*, *GPX7* και *PRDX1*) κυρίως στο επίπεδο των τυφλών. Η προσθήκη ΦΒΣ αύξησε τις εκφράσεις *CAT*, *SOD1*, *NQO1*, *GSR*, *PRDX1* και *TXN* στον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου και παράλληλα η προσθήκη ΦΒΣ είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ΟΑΙ στη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά. Εν κατακλείδι από τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι πέρα από τα γνωστά οφέλη του ΦΒΣ για τις παραγωγικές αποδόσεις που επιβεβαιώθηκαν και από αυτή τη μελέτη, το ΦΒΣ επηρέασε σημαντικά την αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού, την αποτοξίνωση και τη διαχείριση φλεγμονής σε εντερικό επίπεδο. Είναι ενδιαφέρον ότι αποδείχθηκε ότι όταν το ΦΒΣ χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το σιτηρέσιο χαμηλών προδιαγραφών, το δυναμικό κυτταροπροστασίας στο έντερο μεγιστοποιήθηκε.

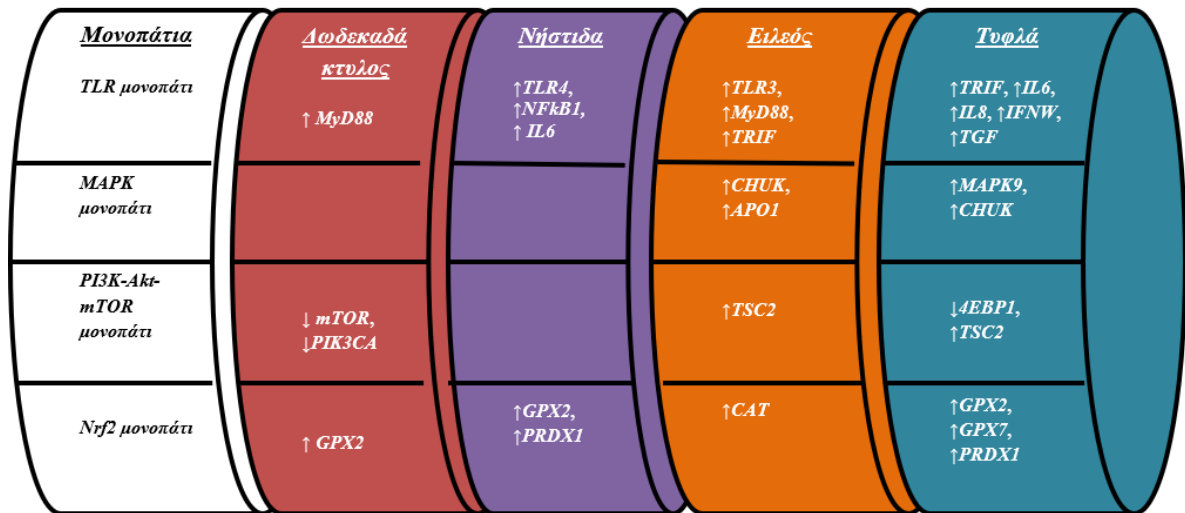
Τα παραπάνω αποτελέσματα δημιούργησαν νέα ερωτήματα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης του ΦΒΣ αλλά και των επιπτώσεων της μείωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ. Για αυτό το λόγο έγινε η εκπόνηση της 2^{ης} μελέτης, με σκοπό την προσθήκη γνώσης για τη διαχείριση της φλεγμονής, την απόπτωση και τον μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών σε περίπτωση προσθήκης του ΦΒΣ σε σιτηρέσιο με μειωμένα επίπεδα ΜΕ και ΟΠ. Ειδικότερα, σε σύγκριση με τον τύπο σιτηρεσίου 100% ΜΕ και ΟΠ (Η), αποδείχθηκε ότι το σιτηρέσιο 95% ΜΕ και ΟΠ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την κυτταρική απόπτωση ανάλογα με το εντερικό τμήμα. Επίσης, η μειωμένη πρόσληψη ενέργειας και θρεπτικών συστατικών στην περίπτωση των προδιαγραφών σιτηρεσίου 95% ΜΕ και ΟΠ έγινε αισθητή από το μονοπάτι *mTOR*, κάτι που σε αυτή τη μελέτη τεκμηριώθηκε και με τη μειωμένη απόδοση ανάπτυξης των ορνιθίων.

Παράλληλα, η προσθήκη του ΦΒΣ μείωσε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο της φλεγμονής σε όλο το μήκος του εντέρου ενώ τα αποτελέσματα για τα άλλα δύο μονοπάτια εμφανίστηκαν στη νήστιδα για το μονοπάτι της κυτταρικής απόπτωσης όπου παρατηρήθηκε μείωση δύο κρίσιμων γονιδίων και στα τυφλά για το μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης όπου παρατηρήθηκε αύξηση του *4EBP1*. Τα ευρήματα της 2^{ης} μελέτης εξηγούν περαιτέρω τη μειωμένη απόδοση των ορνιθίων που παρατηρείται όταν τα ορνίθια κρεοπαραγωγής τρέφονταν με σιτηρέσιο χαμηλών προδιαγραφών ή σιτηρέσιο χωρίς ΦΒΣ. Το σιτηρέσιο υψηλών προδιαγραφών αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει αυτά τα μονοπάτια σε χαμηλότερα ομοιοστατικά επίπεδα, υποδηλώνοντας ότι περισσότερη ενέργεια και θρεπτικά συστατικά διατίθενται για παραγωγικούς σκοπούς. Η προσθήκη ΦΒΣ ενήργησε επίσης με παρόμοιο τρόπο με το σιτηρέσιο υψηλών προδιαγραφών σε σχέση με τη διαμόρφωση των συστατικών των μονοπατιών που αξιολογήθηκαν. Το τελευταίο τεκμηριώνει την ικανότητα του ΦΒΣ να εξουδετερώνει τις απώλειες απόδοσης σε μειωμένες προδιαγραφές σιτηρεσίου. Συνοπτικά τα αποτελέσματα για την γονιδιακή έκφραση των μονοπατιών της πρώτης και της τρίτης μελέτης παρουσιάζονται στα σχήματα 21 και 22. Το πρώτο σχήμα αφορά τις επιδράσεις του σιτηρεσίου 95% ΜΕ και ΟΠ στα μονοπάτια που μελετήθηκαν σε σύγκριση με το σιτηρέσιο 100% ΜΕ και ΟΠ. Το δεύτερο σχήμα αφορά την επίδραση της προσθήκης ΦΒΣ στα εξεταζόμενα μονοπάτια. Οι επιδράσεις του σιτηρεσίου μειωμένων προδιαγραφών συγκεντρώνονται στα τυφλά έντερα ενώ οι επιδράσεις του ΦΒΣ στον δωδεκαδάκτυλο.

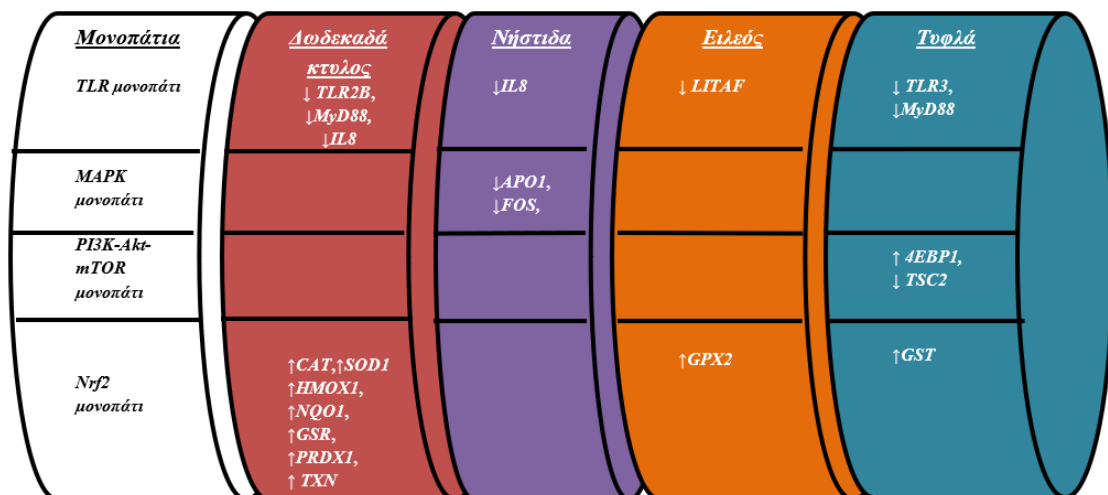
Παρόμοια ευεργετικά αποτελέσματα στις παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων με την προσθήκη ΦΒΣ έχουν αναφερθεί στο παρελθόν (Mountzouris et al., 2011; Bravo et al., 2014; Paraskeuas et al., 2016). Παράλληλα με τις θετικές επιδράσεις των φυτογενών ενώσεων στα παραγωγικά χαρακτηριστικά πρόσφατα στοιχεία αποκαλύπτουν ότι τα ΦΒΣ μπορούν να τροποποιούν ευεργετικά το μονοπάτι Nrf2/ARE στο έντερο των ορνιθίων (Mountzouris et al., 2020). Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι η προσθήκη ΦΒΣ ενεργοποίησε την έκφραση κρίσιμων γονιδίων για την προστασία των ορνιθίων από την οξειδωτική καταπόνηση κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο και στα τυφλά έντερα. Το ΦΒΣ που χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα αυτή είχε ως ένα από τα βασικά συστατικά του την καρβακρόλη όπως και το ΦΒΣ που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες 1 και 2.

Οι φυτογενείς ενώσεις πέρα από τα οφέλη τους για τα παραγωγικά χαρακτηριστικά και την αύξηση της εντερικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα ορνίθια κρεοπαραγωγής

(Paraskeuas et al., 2016, 2017a; b; Mountzouris et al., 2019, 2020, 2022) κεντρίζουν το ενδιαφέρον και για τον λειτουργικό τους ρόλο σε κρίσιμα στοιχεία της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού και της φλεγμονής (Hassan and Awad, 2017; Paraskeuas and Mountzouris, 2019a; Paraskeuas and Mountzouris, 2019b). Τα γονίδια που σχετίζονται με την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού παρόλο που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Για αυτό και εξετάστηκαν διαφορετικά μονοπάτια που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία. Οι Hassan and Awad το 2017 παρατήρησαν σημαντική μείωση στην έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων (*IL6*, *IFN-γ*, *TNF-α*) αλλά και στον μεταγραφικό παράγοντα *NFκB1* στη νήστιδα των ορνίθων με την προσθήκη θυμόλης στο σιτηρέσιο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα της 2^{ης} μελέτης με τη μόνη διαφορά ότι τα περισσότερα αποτελέσματα για την 2^η μελέτη παρατηρούνται στον δωδεκαδάκτυλο.



Σχήμα 21. Επιδράσεις του σιτηρεσίου L σε σύγκριση με το σιτηρέσιο H στο μονοπάτι σηματοδότησης TLR, στο μονοπάτι σηματοδότησης MAPK και PI3K-Akt-mTOR και στο μονοπάτι Nrf2 σε όλο το μήκος του εντέρου (προσαρμοσμένο από Griela et al., 2021b).



Σχήμα 22. Ευεργετικές επιδράσεις της προσθήκης ΦΒΣ1 στα μονοπάτια σηματοδότησης TLR, MAPK, PI3K-Akt-mTOR και Nrf2 σε όλο το μήκος του εντέρου (προσαρμοσμένο από Griela et al., 2021b).

Αυτή η διαφορά μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι το ΦΒΣ που χρησιμοποιήθηκε είχε και άλλα φυτογενή συστατικά (όπως η καρβακρόλη και η μενθόλη) που μπορεί να δρουν και να απορροφώνται καλύτερα στο δωδεκαδάκτυλο. Η αντιφλεγμονώδης και η αντιοξειδωτική δράση του ΦΒΣ που παρατηρήθηκαν στη μελέτη 1 και 2 δεν αποτυπώνεται ξεκάθαρα στα μονοπάτια της απόπτωσης και της πρωτεϊνοσύνθεσης. Παρόλα αυτά η μείωση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση στη νήστιδα των ορνιθίων με την προσθήκη του ΦΒΣ είναι σε συμφωνία με τις μελέτες του Liang et al., (2014) και των Huang and Lee, (2018) που ανέφεραν την αναστολή των μονοπατιών σηματοδότησης MAPK από φυτογενή συστατικά.

Ακόμα, σε άλλα είδη ζώων έχουν μελετηθεί αρκετά τα μονοπάτια για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη ικανότητα των ΦΒΣ (Karásková et al., 2015; Yang et al., 2015; Vanessa Valenzuela-Grijalva et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα χοίρου με την προσθήκη διάφορων φυτογενών συστατικών έχουν παρατηρηθεί πιθανά οφέλη στη ρύθμιση της εντερικής ανοσολογικής απόκρισης και της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης μέσω ρύθμισης γονιδίων που σχετίζονται με τα 2 αυτά μεταβολικά μονοπάτια (Kaschubek et al., 2018). Παράλληλα, μελέτη σε αρσενικούς αρουραίους έδειξε ότι η προσθήκη φυτογενούς πρόσθετου που περιέχει γαϊδουράγκαθο και αγκινάρα επιφέρει προστατευτικές επιδράσεις στην αντιοξειδωτική κατάσταση, στις ανοσολογικές παραμέτρους και στις ηπατικές λειτουργίες υπό συνθήκες μικτού στρες (Koseli et al., 2022). Παρόλα αυτά για τα μονοπάτια MAPK και mTOR δεν υπάρχουν έρευνες που να μελετούν τις αλλαγές τους με την προσθήκη φυτογενών συστατικών είτε στα ορνίθια είτε σε άλλα είδη ζώων.

Όπως είδαμε παραπάνω οι επιδράσεις των ΦΒΣ στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής έχει μελετηθεί από πλήθος εργασιών. Παρόλα αυτά οι αλληλεπιδράσεις τους με τη μείωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στο σιτηρέσιο με την ταυτόχρονη διατήρηση του λόγου ΜΕ προς ΟΠ σταθερού είναι ελάχιστες στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα παραγωγικά αποτελέσματα της μελέτης 1 και 2 ως προς το επίπεδο διατροφής ήταν παρόμοια με προηγούμενες μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις στην απόδοση και τις σχετικές βιολογικές αποκρίσεις (Bravo et al., 2014; Yang et al., 2015; Paraskeuas et al., 2016; Taleb et al., 2017). Ωστόσο, μια μόνο από αυτές μελετά την αλληλεπίδραση των ΦΒΣ με τη μείωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στο σιτηρέσιο (Paraskeuas et al., 2016). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η προσθήκη των ΦΒΣ έτεινε να αντισταθμίσει τις αρνητικές επιδράσεις της μείωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στις

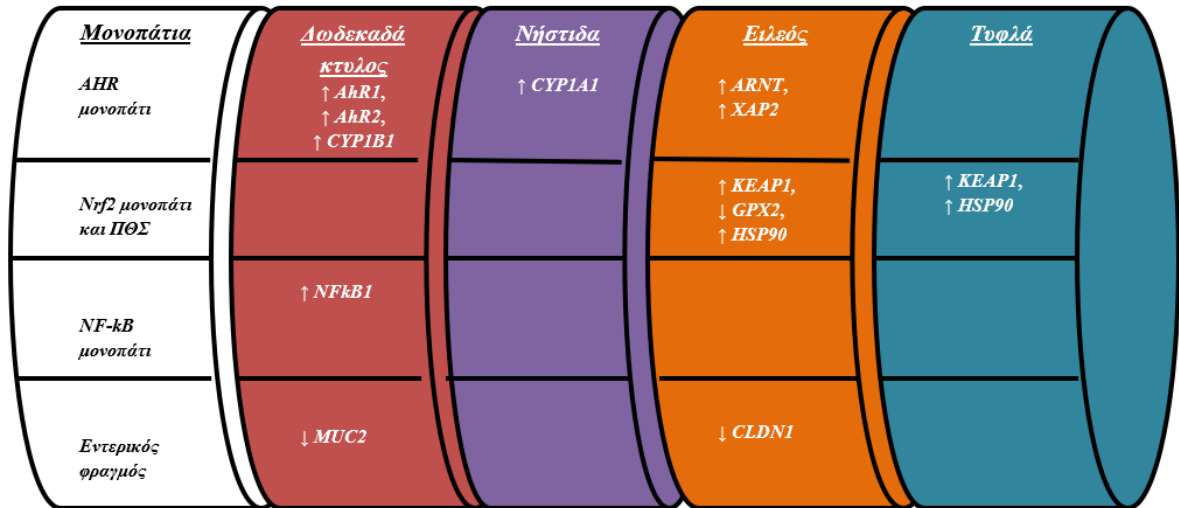
παραγωγικές αποδόσεις πράγμα που στη μελέτη 1 και 2 φάνηκε σαν στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα. Όσον αφορά τα γονίδια που μελετήθηκαν στις έρευνες 1 και 2 παρόμοια αποτελέσματα για τα αντιοξειδωτικά γονίδια βρέθηκαν στο μονοπάτι Nrf2/ARE για ενήλικες ανθρώπους με τη μείωση της διατροφικής ενέργειας και πρωτεΐνης (Lee et al., 2016; Delles et al., 2014). Παράλληλα, σε άλλη μελέτη με πειραματικά μοντέλα ανθρώπους παρατηρήθηκε ότι η χαμηλότερη πρόσληψη πρωτεϊνών αυξάνει τη φλεγμονώδη απόκριση αποτέλεσμα που συμφωνεί με τις μελέτες 1 και 2 (Hruby and Jacques, 2019). Τέλος, σε συμφωνία με τις μελέτες 1 και 2 παρατηρήθηκε σε ποντίκια G93A ότι ο περιορισμός των θερμίδων αυξάνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων, τη φλεγμονή και την απόπτωση (Patel et al., 2010).

Συνολικά, διαπιστώθηκε από τις μελέτες 1 και 2 ότι η προσθήκη ΦΒΣ παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αλλαγή για την αντιστάθμιση των αρνητικών συνεπειών της ελάττωσης των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ στα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Ταυτόχρονα η προσθήκη ΦΒΣ παρουσίασε ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο με την αύξηση των μοριακών βιοδεικτών του Nrf2/ARE μονοπατιού αλλά και στα υπόλοιπα τμήματα του εντέρου αφού παρατηρήθηκε αυξημένη ΟΑΙ σε όλο το μήκος του εντέρου. Ταυτόχρονα διαπιστώθηκε ευεργετική επίδραση με την προσθήκη του ΦΒΣ επί της εντερικής υγείας μειώνοντας την έκφραση των γονιδίων TLRs, των προφλεγμονωδών κυτοκινών καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση. Νέα στοιχεία επίσης δόθηκαν για την εξήγηση των βελτιωμένων αποδόσεων με την προσθήκη του ΦΒΣ που τροποποίησε ευεργετικά το μονοπάτι που σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν επίσης νέα γνώση για τους μηχανισμούς επίδρασης των ΦΒΣ σε συνδυασμό με την ελάττωση των επιπέδων ΜΕ και ΟΠ, με διατήρηση σταθερού ΜΕ προς ΟΠ. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη μιας πλατφόρμας γονιδίων κρίσιμων για την αντιοξειδωτική ικανότητα και την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία του οργανισμού μπορεί να δώσει νέες προοπτικές για τον έλεγχο του οργανισμού πριν εκδηλωθούν οι συνέπειες κάποιας στρεσογόνας κατάστασης όπως είναι η έλλειψη κάλυψης των διατροφικών αναγκών όχι μόνο για τα πτηνά αλλά και για τον άνθρωπο.

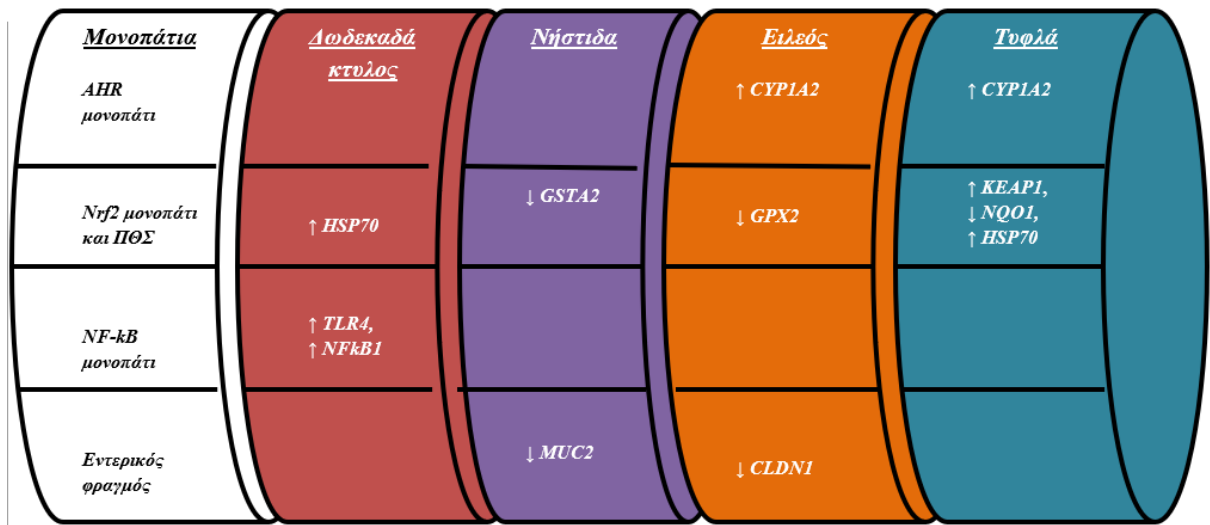
Στην τρίτη μελέτη, πραγματοποιήθηκε προσθήκη των δύο πιο κύριων μυκοτοξινών που προσβάλλουν τα πτηνά, της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών σε ένα δύσπεπτο-δυσβιωτικό σιτηρέσιο. Κύριος σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών στο μέγιστο επιτρεπτό όριο

από την ΕΕ επί της έκφρασης μοριακών βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, το στρες, τη φλεγμονώδη απόκριση και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού καθώς και των παραγωγικών αποδόσεων. Το δυσβιωτικό σιτηρέσιο επιλέχθηκε για να εντείνει τυχόν αρνητικές επιδράσεις των μυκοτοξινών.

Τα αποτελέσματα της 3^{ης} μελέτης έδειξαν ότι τόσο η δεοξυνιβαλενόλη όσο και οι φουμονισίνες όταν προστέθηκαν σε 5 mg/kg και 20 mg/kg σιτηρεσίου, αντίστοιχα, επηρέασαν αρνητικά τα παραγωγικά χαρακτηριστικά μειώνοντας το ΡΑΣΒ των ορνιθίων. Επιπλέον, η προσθήκη φουμονισινών μείωσε και τη συνολική ΚΤ. Η παρουσία δεοξυνιβαλενόλης και φουμονισινών στα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια της ΕΕ, αυξάνει τη διαδικασία της εντερικής αποτοξίνωσης που σχετίζεται με το μονοπάτι AhR. Από τις δύο μυκοτοξίνες που μελετήθηκαν, η DON είχε ισχυρότερο αποτέλεσμα σε σύγκριση με τη FUM. Ωστόσο, τόσο η DON όσο και η FUM μειώνουν τους βιοδείκτες του μονοπατιού της αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2 κατά μήκος του εντέρου. Το τελευταίο θα μπορούσε να έχει ως συνέπεια διάφορες ελλείψεις στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και τον έλεγχο της φλεγμονής. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (ΠΘΣ) και των βιοδεικτών που σχετίζονται με τη φλεγμονή (π.χ. NF-kB) από την DON και την FUM υπογραμμίζει και επιβεβαιώνει την ανάγκη για τον επαρκή έλεγχο ύπαρξης και μείωσης των μυκοτοξινών. Τέλος, στην παρούσα μελέτη, η DON μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του MUC2 στο δωδεκαδάκτυλο και του CLDN1 στον ειλεό ενώ οι FUM μείωσαν το MUC2 στη νήστιδα και το CLDN1 στον ειλεό. Συνοπτικά τα αποτελέσματα για την γονιδιακή έκφραση των μονοπατιών της δεύτερης μελέτης παρουσιάζονται στα Σχήματα 23 και 24. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι επιδράσεις της προσθήκης δεοξυνιβαλενόλης (DON) στα μονοπάτια σηματοδότησης που μελετήθηκαν στην 3^η μελέτη ενώ στο σχήμα οι επιδράσεις των φουμονισινών (FUM) σε όλο το μήκος του εντέρου.



Σχήμα 23. Επιδράσεις της προσθήκης δεοξυνιβαλενόλης (DON) στα μονοπάτια σηματοδότησης που μελετήθηκαν στη 2η μελέτη σε όλο το μήκος του εντέρου (προσαρμοσμένο από Griela et al., 2021b).



Σχήμα 24. Επιδράσεις της προσθήκης φουμονισινών (FUM) στα μονοπάτια σηματοδότησης που μελετήθηκαν στη 2η μελέτη σε όλο το μήκος του εντέρου (προσαρμοσμένο από Griela et al., 2021b).

Παρόμοια αρνητικά αποτελέσματα στις παραγωγικές αποδόσεις των ορνιθίων με την προσθήκη δεοξυνιβαλενόλης και φουμονισινών έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν ακόμη και σε συγκεντρώσεις κοντά στους περιορισμούς της ΕΕ (5 και 20 mg/kg δίαιτας, αντίστοιχα) (Yunus et al., 2012; Antonissen et al., 2015; Grenier et al., 2016; Lucke et al., 2018; Santos and van Eerden, 2021). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο υψηλό γενετικό δυναμικό ανάπτυξης των σύγχρονων ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Με σκοπό να εντοπιστούν οι μηχανισμοί δράσης πίσω από τις επιβλαβείς επιδράσεις της δεοξυνιβαλενόλης και των φουμονισινών στην υγεία του εντέρου και ως εκ τούτου στις παραγωγικές αποδόσεις μελετήθηκε μία παλέτα μοριακών βιοδεικτών για την αξιολόγηση της εντερικής υγείας και ακεραιότητας. Όσον αφορά το μεταβολικό μονοπάτι AhR υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις των δεοξυνιβαλενόλης και φουμονισινών ενώ με την προσθήκη άλλων μυκοτοξινών όπως οι αφλατοξίνες (Muhammad et al., 2017; Ates and Ortatatli, 2021) και η τοξίνη-T2 (Liu et al., 2019) παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση των AhRs και CYPs με την 2^η μελέτη. Επιπλέον, η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έχει παρατηρηθεί βιοχημικά και σε άλλες μελέτες σε ορνίθια κρεοπαραγωγής με τη χορήγηση χαμηλών επιπέδων μυκοτοξινών *Fusarium* κοντά στα όρια της ΕΕ (Jiang et al., 2014; Cheng et al., 2018; Sousa et al., 2020). Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με το εντερικό τμήμα καθώς κάθε κομμάτι του εντέρου έχει διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα (Cheng et al., 2018).

Παράλληλα, σημειώθηκαν παρόμοιες αυξήσεις των επιπέδου του HSP70 στο σπλήνα (Shang et al., 2015) και στο ήπαρ (Jiang et al., 2014) με την προσθήκη μυκοτοξινών *Fusarium* σε ορνίθια 42 ημερών. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε ενδεχομένως να υποδηλώνει ότι, ακόμη και στα ανώτατα όρια της ΕΕ, αυτές οι μυκοτοξίνες δρουν ως στρεσογόνοι παράγοντες στα εντερικά κύτταρα. Επίσης, σε συμφωνία με τα ευρήματα της 2^{ης} μελέτης, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι οι διατροφικές μυκοτοξίνες *Fusarium* που περιλαμβάνονται σε συγκεντρώσεις κοντά στους περιορισμούς της ΕΕ αυξάνουν τα TLRs (Lucke et al., 2018; Guo et al., 2021) και τις προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Grenier et al., 2016; Grenier et al., 2017; Lucke et al., 2018; Guo et al., 2021) στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Τέλος, παρόμοια αποτελέσματα για τους βιοδείκτες εντερικής ακεραιότητας παρατηρήθηκαν σε μελέτες με την προσθήκη μυκοτοξινών *Fusarium* που καταναλώθηκαν σε επίπεδα κοντά στα όρια της ΕΕ (Cheng et al., 2018; Azizi et al., 2021) στη νήστιδα ορνιθίων 42 ημερών.

Συνολικά, από την 3^η μελέτη, δημιουργήθηκε μια ισχυρή πλατφόρμα μοριακών βιοδεικτών υψίστης σημασίας για την εντερική αποτοξίνωση, την αντιοξειδωτική απόκριση, την φλεγμονώδη απόκριση και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού η οποία έδωσε την δυνατότητα διερεύνησης της βιολογικής απόκρισης σε ξενοβιοτικά όπως είναι οι μυκοτοξίνες δεοξυνιβαλενόλη και φουμονισίνες στα ορνίθια. Όπως παρατηρείται και στα σχήματα η δεοξυνιβαλενόλη είχε ισχυρότερο αποτέλεσμα σε σύγκριση με τις φουμονισίνες όσον αφορά την αποτοξίνωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ παράλληλα παρατηρείται και διαφορετική δράση ανάλογα με το τμήμα του εντέρου και τη μυκοτοξίνη. Η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πιθανόν είχε αντίκτυπο και στον έλεγχο της φλεγμονής καθώς παρατηρήθηκε και για τις 2 μυκοτοξίνες αύξηση του *NFκB1* στο δωδεκαδάκτυλο.

Συμπερασματικά, οι διαφορετικοί διατροφικοί παράγοντες στις μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ΔΔ έδειξαν να επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση κρίσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική ακεραιότητα και λειτουργία. Αρχικά επιβεβαιώθηκε ο ρόλος των ΦΒΣ ως αυξητικών παραγόντων από τις μελέτες 1 και 2. Η επιβεβαίωση αυτή έγινε μέσω των καλύτερων παραγωγικών αποδόσεων αλλά και της τροποποίησης γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη και την πρωτεϊνοσύνθεση. Επίσης, η ευεργετική επίδραση του ΦΒΣ1 επί του ΣΕΤ πιθανόν να οφείλεται στην βελτίωση της γενικότερης εντερικής υγείας αφού ο οργανισμός δεν «ξοδεύει» την ενέργειά και τα θρεπτικά συστατικά της τροφής του για την παραγωγή βιοδεικτών που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση. Τέλος, παρατηρήθηκε και βιοχημικά και μοριακά, ότι τα ΦΒΣ δρουν ως ενισχυτές της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Άρα μια πιθανή παλέτα μοριακών βιοδεικτών που προτείνεται να διερευνάται για τον έλεγχο ενός ΦΒΣ μπορεί να περιλαμβάνει το Nrf2 μονοπάτι, το TLR μονοπάτι καθώς και το PI3K-Akt-mTOR μονοπάτι.

Οι μυκοτοξίνες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ΔΔ στα ανώτατα επιτρεπτά όρια από την ΕΕ φάνηκαν να επηρεάζουν δυσμενώς τα παραγωγικά χαρακτηριστικά και να αυξάνουν τον ΣΕΤ. Οι μηχανισμοί δράσης πίσω από αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν να αφορούν κυρίως τα μονοπάτια που σχετίζονται με την εντερική αποτοξίνωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα και για την DON και για τις FUM. Επομένως, μια πιθανή παλέτα μοριακών βιοδεικτών που προτείνεται να διερευνάται για τον έλεγχο της δράσης των μυκοτοξινών σε χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να περιλαμβάνει το AHR μονοπάτι και το Nrf2 μονοπάτι. Αν η συγκέντρωση των μυκοτοξινών στην τροφή είναι

μεγαλύτερη προτείνεται να εξετασθεί και το TLR μονοπάτι καθώς ενδέχεται η ύπαρξη φλεγμονώδους απόκρισης σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι φάνηκε στη 3^η μελέτη.

Τέλος, σημαντικά ευρήματα από την 1^η και την 2^η μελέτη βρέθηκαν όσον αφορά την αντιστάθμιση των αρνητικών επιδράσεων της ελάττωσης της ΜΕ και της ΟΠ με την προσθήκη του ΦΒΣ1. Η αντιστάθμιση αυτή αποτυπώνεται και στα παραγωγικά χαρακτηριστικά αλλά και σε μερικούς βιοδείκτες χωρίς όμως να είναι αρκετοί για να εξαχθεί συμπέρασμα για τους μηχανισμούς δράσης. Παράλληλα, τα μοριακά αποτελέσματα που αφορούν το σιτηρέσιο με τις μειωμένες προδιαγραφές δείχνουν μια αυξημένη αντιοξειδωτική απόκριση σε συνδυασμό με αυξημένη φλεγμονώδη απόκριση και πιθανή ενεργοποίηση της κυτταρικής απόπτωσης.

Πίνακας 7.1. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής

	1 ^η + 2 ^η Μελέτη	1 ^η + 2 ^η Μελέτη	3 ^η Μελέτη	3 ^η Μελέτη
Διατροφή/Ξενοβιοτικό	95% ΜΕ+ΟΠ	ΦΒΣ1	DON	FUM
Παραγωγικά Χαρακτηριστικά	↓ ΡΑΣΒ ↓ ΚΤ ↑ ΣΕΤ	↑ ΡΑΣΒ ↓ ΣΕΤ	↓ ΡΑΣΒ	↓ ΡΑΣΒ ↓ ΚΤ
Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα	↓ (N)	↑ (N, E, T)	(δεν μετρήθηκε)	(δεν μετρήθηκε)
Αποτοξίνωση	(δεν μετρήθηκε)	(δεν μετρήθηκε)	↑ <i>AhR1</i> (Δ), ↑ <i>AhR2</i> (Δ), ↑ <i>CYP1B1</i> (Δ), ↑ <i>CYP1A1</i> (N), ↑ <i>ARNT</i> (E), ↑ <i>XAP2</i> (E)	↑ <i>CYP1A1</i> (E,T)
Αντιοξειδωτική απόκριση	↑ <i>GPX2</i> (Δ, N, T), ↑ <i>CAT</i> (E), ↑ <i>GPX7</i> (T), ↑ <i>PRDX1</i> (N,T)	↑ <i>GPX2</i> (E), ↑ <i>CAT</i> (Δ), ↑ <i>SOD1</i> (Δ), ↑ <i>HMOX1</i> (Δ), ↑ <i>NQO1</i> (Δ), ↑ <i>GSR</i> (Δ), ↑ <i>PRDX1</i> (Δ), ↑ <i>TXN</i> (Δ), ↑ <i>GSTA2</i> (T)	↑ <i>KEAP1</i> (E,T), ↓ <i>GPX2</i> (E), ↑ <i>HSP90</i> (E,T)	↑ <i>KEAP1</i> (T), ↓ <i>GPX2</i> (E), ↑ <i>HSP70</i> (Δ,T), ↓ <i>NQO1</i> (T), ↓ <i>GSTA2</i> (N)
Εντερική ακεραιότητα	(καμία διαφορά)	(καμία διαφορά)	↓ <i>MUC2</i> (Δ), ↓ <i>CLDN1</i> (E)	↓ <i>MUC2</i> (N), ↓ <i>CLDN1</i> (E)
Σηματοδότηση φλεγμονώδους απόκριση	↑ <i>TLR3</i> (E), ↑ <i>TLR4</i> (N), ↑ <i>MyD88</i> (Δ,E) ↑ <i>TRIF</i> (E, T), ↑ <i>NF-kB1</i> (N), ↑ <i>IL6</i> (N, T), ↑ <i>IL8</i> (T), ↑ <i>IFNγ</i> (T), ↑ <i>TGF</i> (T)	↓ <i>TLR2B</i> (Δ), ↓ <i>TLR3</i> (T), ↓ <i>MyD88</i> (Δ,T) ↓ <i>IL8</i> (Δ, N), ↓ <i>LITAF</i> (E)	↑ <i>NF-kB1</i> (Δ)	↑ <i>TLR4</i> (Δ), ↑ <i>NF-kB1</i> (Δ)
Κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμός	↓ <i>mTOR</i> (Δ), ↓ <i>PIK3CA</i> (Δ), ↓ <i>4EBP1</i> (T), ↑ <i>TSC2</i> (E, T)	↑ <i>4EBP1</i> (T), ↓ <i>TSC2</i> (T)	(δεν μετρήθηκε)	(δεν μετρήθηκε)
Κυτταρική απόπτωση	↑ <i>CHUK</i> (E,T), ↑ <i>APO1</i> (E), ↑ <i>MAPK9</i> (T)	↓ <i>APO1</i> (N), ↓ <i>FOS</i> (N)	(δεν μετρήθηκε)	(δεν μετρήθηκε)

Δ=δωδεκαδάκτυλος, N=νήστιδα, E=ειλεός, T=τυφλά

Βιβλιογραφία

- Abasht, B., M. G. Kaiser, and S. J. Lamont. 2008. Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 123:314–323.
- Abd El-Hack, M. E., M. T. El-Saadony, M. E. Shafi, S. Y. A. Qattan, G. E. Batiha, A. F. Khafaga, A. M. E. Abdel-Moneim, and M. Alagawany. 2020. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 104:1835–1850.
- Abdelli, N., D. Solà-Oriol, and J. F. Pérez. 2021. Phytogetic feed additives in poultry: Achievements, prospective and challenges. *Animals* 11.
- Abdulameer, S., and A. Alwan. 2022. Improvement of Growth performance, Biochemical Blood Profiles, and Meat Peroxidation by the Inclusion of Mustard Seed Extract in Broilers' Drinking Water. *Arch Razi Inst* 77:429–437 Available at https://archrazi.areeo.ac.ir/article_125416_64a0efd788a4ae1c9792ee1b753c086f.pdf (verified 1 March 2023).
- Afzal, O., A. S. A. Altamimi, B. Mubeen, S. I. Alzarea, W. H. Almalki, S. D. Al-Qahtani, E. M. Atiya, F. A. Al-Abbasi, F. Ali, I. Ullah, M. S. Nadeem, and I. Kazmi. 2022. mTOR as a Potential Target for the Treatment of Microbial Infections, Inflammatory Bowel Diseases, and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 23.
- Agalakova, N. I., and G. P. Gusev. 2012. Molecular Mechanisms of Cytotoxicity and Apoptosis Induced by Inorganic Fluoride. *International Scholarly Research Network ISRN Cell Biology* 2012:16.
- Agriopoulou Sofia, Stamatelopoulou Eygenia, and Varzakas Theodoros. 2020. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods* 9:137.
- Ahiwe, E. U., A. A. Omede, M. B. Abdallh, and P. A. Iji. 2018. Managing Dietary Energy Intake by Broiler Chickens to Reduce Production Costs and Improve Product Quality.in *Animal Husbandry and Nutrition*. InTech.

- Ahmadi, F. 2010. Effect of turmeric (*Curcumin longa*) powder on performance, oxidative stress state and some of blood parameters in broiler fed on diets containing aflatoxin B1. *Glob Vet* 5:312–317.
- Ahmed, S. M. U., L. Luo, A. Namani, X. J. Wang, and X. Tang. 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863:585–597.
- Ahn, C., D. H. Shin, D. Lee, S. M. Kang, J. H. Seok, H. Y. Kang, and E. B. Jeung. 2016. Expression of claudins, occludin, junction adhesion molecule A and zona occludens 1 in canine organs. *Mol Med Rep* 14:3697–3703.
- Aljumaah, M. R., G. M. Suliman, A. A. Abdullatif, and A. M. Abudabos. 2020. Effects of phytobiotic feed additives on growth traits, blood biochemistry, and meat characteristics of broiler chickens exposed to *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci* 99:5744–5751.
- Allen, R. G., and M. Tresini. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28:463–499.
- Ameyar, M., M. Wisniewska, and J. B. Weitzman. 2003. A role for AP-1 in apoptosis: The case for and against. *Biochimie* 85:747–752.
- Andrew James, C., X. I. N. Gang, S. L. Doty, and S. E. Strand. 2008. Degradation of low molecular weight volatile organic compounds by plants genetically modified with mammalian cytochrome P450 2E1. *Environ Sci Technol* 42:289–293.
- Antonissen, G., M. Devreese, S. De Baere, A. Martel, F. Van Immerseel, and S. Croubels. 2017. Impact of *Fusarium* mycotoxins on hepatic and intestinal mRNA expression of cytochrome P450 enzymes and drug transporters, and on the pharmacokinetics of oral enrofloxacin in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology* 101:75–83.
- Antonissen, G., F. Van Immerseel, F. Pasmans, R. Ducatelle, F. Haesebrouck, L. Timbermont, M. Vertinden, G. P. J. Janssens, V. Eeckhaut, M. Eeckhout, S. De Saeger, S. Hessenberger, A. Martel, and S. Croubels. 2014. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. *PLoS One* 9.

- Antonissen, G., F. Van Immerseel, F. Pasmans, R. Ducatelle, G. P. J. Janssens, S. De Baere, K. C. Mountzouris, S. Su, E. A. Wong, B. De Meulenaer, M. Verlinden, M. Devreese, F. Haesebrouck, B. Novak, I. Dohnal, A. Martel, and S. Croubels. 2015. Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens. *J Agric Food Chem* 63:10846–10855.
- Ates, M. B., and M. Ortatatli. 2021. Phase-1 bioactivation mechanisms of aflatoxin through AhR, CAR and PXR nuclear receptors and the interactions with *Nigella sativa* seeds and thymoquinone in broilers. *Ecotoxicol Environ Saf* 208.
- Awad, W. A., K. Ghareeb, A. Dadak, L. Gille, K. Staniek, M. Hess, and J. Böhm. 2012. Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. *Poult Sci* 91:550–555.
- Azizi, T., M. Daneshyar, M. Allymehr, A. S. Jalali, H. K. Behroozyar, and A. Tukmechi. 2021. The impact of deoxynivalenol contaminated diet on performance, immune response, intestine morphology and jejunal gene expression in broiler chicken. *Toxicon* 199:72–78.
- Azuma, T., M. Shigeshiro, M. Kodama, S. Tanabe, and T. Suzuki. 2013. Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *Journal of Nutrition* 143:827–834.
- Bai, S. P., A. M. Wu, X. M. Ding, Y. Lei, J. Bai, K. Y. Zhang, and J. S. Chio. 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult Sci* 92:663–670.
- Baird, L., and A. T. Dinkova-Kostova. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85:241–272.
- Bak, S. M., M. Iida, A. A. Soshilov, M. S. Denison, H. Iwata, and E. Y. Kim. 2017. Auto-induction mechanism of aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) gene by TCDD-activated AHR1 and AHR2 in the red seabream (*Pagrus major*). *Arch Toxicol* 91:301–312.
- Bampidis, V. A., V. Christodoulou, P. Florou-Paneri, E. Christaki, P. S. Chatzopoulou, T. Tsiligianni, and A. B. Spais. 2005. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early

- maturing turkeys Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *Br Poult Sci* 46:595–601 Available at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cbps20> (verified 28 November 2022).
- Banerjee, S., and J. Ghosh. 2016. Drug Metabolism and Oxidative Stress: Cellular Mechanism and New Therapeutic Insights. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* s3.
- Barroso, A., J. V. Mahler, P. H. Fonseca-Castro, and F. J. Quintana. 2021. The aryl hydrocarbon receptor and the gut–brain axis. *Cell Mol Immunol* 18:259–268.
- Bartoňková, I., and Z. Dvořák. 2018. Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food and Chemical Toxicology* 111:374–384.
- Basit, M. A., A. A. Kadir, T. C. Loh, S. A. Aziz, A. Salleh, Z. A. Zakaria, and S. B. Idris. 2020. Comparative efficacy of selected phytobiotics with halquinol and tetracycline on gut morphology, ileal digestibility, cecal microbiota composition and growth performance in broiler chickens. *Animals* 10:1–18.
- Basmacioğlu-Malayoğlu, H., P. Ozdemir, and H. A. Bağriyanik. 2016. Influence of an organic acid blend and essential oil blend, individually or in combination, on growth performance, carcass parameters, apparent digestibility, intestinal microflora and intestinal morphology of broilers. *Br Poult Sci* 57:227–234.
- Bauer, H., J. Zweimueller-Mayer, P. Steinbacher, A. Lametschwandtner, and H. C. Bauer. 2010. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *J Biomed Biotechnol* 2010:11 Available at </pmc/articles/PMC2836178/> (verified 20 February 2023).
- Baxter, M., A. Richmond, U. Lavery, and N. E. O’Connell. 2021. A comparison of fast growing broiler chickens with a slower-growing breed type reared on Higher Welfare commercial farms. *PLoS One* 16.
- Berres, J., S. L. Vieira, W. A. Dozier, M. E. M. Cortês, R. de Barros, E. T. Nogueira, and M. Kutschenko. 2010. Broiler responses to reduced-protein diets

- supplemented with valine, isoleucine, glycine, and glutamic acid. *Journal of Applied Poultry Research* 19:68–79.
- Beski, S. S. M., R. A. Swick, and P. A. Iji. 2015. Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review. *Animal Nutrition* 1:47–53.
- Bocci, V., and G. Valacchi. 2015. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem* 3.
- Bortoli, S., E. Boutet-Robinet, D. Lagadic-Gossmann, and L. Huc. 2018. Nrf2 and AhR in metabolic reprogramming after contaminant exposure. *Curr Opin Toxicol* 8:34–41.
- Botsoglou, N., E. Christaki, P. Florou-Paneri, I. Giannenas, G. Papageorgiou, and A. B. Spais. 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 Available at <http://www.sasas.co.za/Sajas.html>.
- Botsoglou NA, Christaki E, Florou-Paneri P, Giannenas I, Papageorgiou G, and Spais AB. 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* 34:52–61 Available at <https://journals.co.za/doi/epdf/10.10520/EJC94355> (verified 14 November 2022).
- Bottje G. Walter, Kong Byung-Whi, Lee Jeong Yoon, Washington Tyrone, Baum I. Jamie, Dridi Sami, Wing Terry, and Hardiman John. 2014. Potential Roles of mTOR and Protein Degradation Pathways in the Phenotypic Expression of Feed Efficiency in Broilers. *Biochemistry & Physiology: Open Access* 03.
- Bravo, D., V. Pirgozliev, and S. P. Rose. 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* 92:1531–1536 Available at <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/92/4/1531/4703312>.
- Bravo, D., P. Utterback, and C. M. Parsons. 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. *Journal of Applied Poultry Research* 20:115–120.

- Brenes, A., and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Anim Feed Sci Technol* 158:1–14.
- Carvalho, R. H., E. I. Ida, M. S. Madruga, • Massami Shimokomaki, and M. Estévez. 2019. Collapse of the endogenous antioxidant enzymes in post-mortem broiler thigh muscles triggers oxidative stress and impairs water-holding capacity. Available at <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03611-1> (verified 13 November 2022).
- Chalana, G., S. Sihag, A. Kumar, and A. Magotra. 2022. Expression profiling of immune genes associated with black pepper (*Piper nigrum*) powder supplementation in the diets of broiler chickens. *Anim Biotechnol*.
- Chau, L. Y. 2015. Heme oxygenase-1: Emerging target of cancer therapy. *J Biomed Sci* 22.
- Chelakkot, C., J. Ghim, and S. H. Ryu. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50.
- Chen, J., S. Yang, P. Li, A. Wu, E. Nepovimova, M. Long, W. Wu, and K. Kuca. 2022. MicroRNA regulates the toxicological mechanism of four mycotoxins in vivo and in vitro. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2022 13:1 13:1–12 Available at <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-021-00653-4> (verified 18 January 2023).
- Cheng, Y., Q. Xu, Y. Chen, Y. Su, C. Wen, and Y. Zhou. 2018. Modified palygorskite improves immunity, antioxidant ability, intestinal morphology, and barrier function in broiler chickens fed naturally contaminated diet with permitted feed concentrations of fusarium mycotoxins. *Toxins (Basel)* 10.
- Chiba, T., H. Uchi, G. Tsuji, H. Gondo, Y. Moroi, and M. Furue. 2011. Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulm Pharmacol Ther* 24:133–140.
- Cho, C. G., H. J. Kim, S. W. Chung, K. J. Jung, K. H. Shim, B. P. Yu, J. Yodoi, and H. Y. Chung. 2003. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp Gerontol* 38:539–548.

- Couto, N., J. Wood, and J. Barber. 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* 95:27–42.
- Croom, E. 2012. Metabolism of xenobiotics of human environments. Pages 31–88 in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.
- Cross, D. E., R. M. Mcdevitt, K. Hillman, and T. Acamovic. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci* 48:496–506 Available at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cbps20> (verified 14 November 2022).
- Das, Q., J. Tang, X. Yin, K. Ross, K. Warriner, M. F. Marcone, and M. S. Diarra. 2021. Organic cranberry pomace and its ethanolic extractives as feed supplement in broiler: impacts on serum Ig titers, liver and bursal immunity. *Poult Sci* 100:517–526.
- Delles, R. M., Y. L. Xiong, A. D. True, T. Ao, and K. A. Dawson. 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.
- Ding, X., C. W. Yang, and Z. B. Yang. 2017. Effects of star anise (*Illicium verum* Hook.f.), essential oil, and leavings on growth performance, serum, and liver antioxidant status of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 26:459–466.
- Du, E., W. Wang, L. Gan, Z. Li, S. Guo, and Y. Guo. 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.
- El-Kazaz, S. E. 2018. EVALUATION OF BEHAVIOR AND WELFARE IN BROILERS REARED IN TWO DIFFERENT HOUSING SYSTEMS.

- Emili Vinolya, R., U. Balakrishnan, B. Yasir, and S. Chandrasekar. 2021. Effect of dietary supplementation of acidifiers and essential oils on growth performance and intestinal health of broiler. *Journal of Applied Poultry Research* 30.
- England, A., K. Gharib-Naseri, S. K. Kheravii, and S. B. Wu. 2023a. Influence of sex and rearing method on performance and flock uniformity in broilers—implications for research settings. *Animal Nutrition* 12:276–283.
- England, A. D., S. Musigwa, A. Kumar, A. Daneshmand, K. Gharib-Naseri, S. K. Kheravii, G. Pesti, and S. B. Wu. 2023b. Sex proportion as a covariate increases the statistical test power in growth performance based experiments using as-hatched broilers. *PLoS One* 18.
- Erdoğan, Z., S. Erdoğan, Ö. Aslantaş, and S. Çelik. 2010. Effects of dietary supplementation of synbiotics and phytobiotics on performance, caecal coliform population and some oxidant/antioxidant parameters of broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 94.
- Fang, Y., C. Yan, Q. Zhao, B. Zhao, Y. Liao, Y. Chen, D. Wang, and D. Tang. 2022. The Association Between Gut Microbiota, Toll-Like Receptors, and Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Oncol* 16.
- Filazi, A., B. Yurdakok-Dikmen, O. Kuzukiran, U. T. Sireli, A. Filazi, B. Yurdakok-Dikmen, O. Kuzukiran, and U. T. Sireli. 2017. Mycotoxins in Poultry. *Poult Sci* Available at <https://www.intechopen.com/state.item.id> (verified 19 December 2022).
- Flees, J. J., N. K. Emami, E. Greene, B. Ganguly, S. Dridi, J. J. ; Emami, N. K. ; Greene, E. ; Ganguly, B. ; Dridi, and J. Francisco Pérez. 2021a. Phytogetic Water Additives Improve Broiler Growth Performance via Modulation of Intermediary Metabolism-Related Signaling Pathways Citation: Flees. 11:750.
- Flees, J. J., B. Ganguly, and S. Dridi. 2021b. Phytogetic feed additives improve broiler feed efficiency via modulation of intermediary lipid and protein metabolism-related signaling pathways. *Poult Sci* 100.

- Flees, J., E. Greene, B. Ganguly, and S. Dridi. 2020. Phytogenic feed- and water-additives improve feed efficiency in broilers via modulation of (an)orexigenic hypothalamic neuropeptide expression. *Neuropeptides* 81.
- Fontana, L. 2009. The scientific basis of caloric restriction leading to longer life. *Curr Opin Gastroenterol* 25:144–150 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19262201/> (verified 8 March 2023).
- Franz, C., K. H. C Baser, W. Windisch, A. Cristina Figueiredo, and M. Graça Miguel. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding-a European perspective. A review. *†,#*. 25:327–340.
- Freitas, D. M., S. L. Vieira, C. R. Angel, A. Favero, and A. Maiorka. 2011. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *Journal of Applied Poultry Research* 20:322–344.
- Gao, C. Q., H. Q. Shi, W. Y. Xie, L. H. Zhao, J. Y. Zhang, C. Ji, and Q. G. Ma. 2021. Dietary supplementation with acidifiers improves the growth performance, meat quality and intestinal health of broiler chickens. *Animal Nutrition* 7:762–769.
- Gheisar, M. M., and I. H. Kim. 2017. Phytobiotics in poultry and swine nutrition-a review. *Ital J Anim Sci* 17:92–99 Available at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjas20> (verified 28 November 2022).
- Giacobbo, F. C. N., C. Eyng, R. V. Nunes, C. de Souza, L. V. Teixeira, R. Pilla, J. S. Suchodolski, and C. Bortoluzzi. 2021. Influence of enzyme supplementation in the diets of broiler chickens formulated with different corn hybrids dried at various temperatures. *Animals* 11:1–20.
- El Golli Bennour, E., C. Bouaziz, M. Ladjimi, F. Renaud, and H. Bacha. 2009. Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin a toxicities on cultured HepG2 cells: Is oxidative stress a common process? *Environ Toxicol* 24:538–548.
- Gopi, M., K. Karthik, H. Manjunathachar, P. Tamilmahan, M. Kesavan, M. Dashprakash, B. Balaraju, and M. Purushothaman. 2014. Essential Oils as a Feed Additive in Poultry Nutrition. *Adv Anim Vet Sci* 2.

- Grenier, B., I. Dohnal, R. Shanmugasundaram, S. D. Eicher, R. K. Selvaraj, G. Schatzmayr, and T. J. Applegate. 2016. Susceptibility of broiler chickens to coccidiosis when fed subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins—special emphasis on the immunological response and themycotoxin interaction. *Toxins* (Basel) 8.
- Grenier, B., H. E. Schwartz-Zimmermann, C. Gruber-Dorninger, I. Dohnal, M. Aleschko, G. Schatzmayr, W. D. Moll, and T. J. Applegate. 2017. Enzymatic hydrolysis of fumonisins in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Poult Sci* 96:4342–4351.
- Griela, E., V. Paraskeuas, and K. C. Mountzouris. 2021. Effects of diet and phytogetic inclusion on the antioxidant capacity of the broiler chicken gut. *Animals* 11:1–15.
- Guo, S., R. Al-Sadi, H. M. Said, and T. Y. Ma. 2013. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol* 182:375–387 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201091/> (verified 10 January 2023).
- Guo, F., F. Wang, H. Ma, Z. Ren, X. Yang, and X. Yang. 2021. Study on the interactive effect of deoxynivalenol and *Clostridium perfringens* on the jejunal health of broiler chickens. *Poult Sci* 100.
- Gutiérrez-Vázquez, C., and F. J. Quintana. 2018. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48:19–33.
- Guzmán-Mejía, F., M. Godínez-Victoria, A. Vega-Bautista, J. Pacheco-Yépez, and M. E. Drago-Serrano. 2021. Molecular Sciences Intestinal Homeostasis under Stress Siege. *J. Mol. Sci*:22.
- Hadacek, F., and G. Bachmann. 2015. Low-molecular-weight metabolite systems chemistry. *Front Environ Sci* 3.
- Hafeez, A., K. Männer, C. Schieder, and J. Zentek. 2016. Effect of supplementation of phytogetic feed additives (powdered vs. encapsulated) on performance and nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult Sci* 95:622–629.

- Haunshi, S., A. K. Burrumsetty, T. R. Kannaki, K. S. Raja Ravindra, and R. N. Chatterjee. 2017. Pattern recognition receptor genes expression profiling in indigenous chickens of India and White Leghorn. *Poult Sci* 96:3052–3057.
- Hay, N., and N. Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926–1945.
- Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, and J. Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.
- Hernández, F., J. Madrid, V. García, J. Orengo, and M. D. Megías. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci* 83:169–174.
- Houshmand, M., K. Azhar, I. Zulkifli, M. H. Bejo, and A. Kamyab. 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* 42:22–32 Available at http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-15892012000100003 (verified 16 February 2023).
- Hruby, A., and P. F. Jacques. 2019. Dietary protein and changes in biomarkers of inflammation and oxidative stress in the Framingham Heart Study offspring cohort. *Curr Dev Nutr* 3:nzz019.
- Hu, X., X. Li, C. Xiao, L. Kong, Q. Zhu, and Z. Song. 2021. Effects of Dietary Energy Level on Performance, Plasma Parameters, and Central AMPK Levels in Stressed Broilers. *Front Vet Sci* 8.
- Huang, T., Q. Che, X. Chen, D. Chen, B. Yu, J. He, H. Chen, H. Yan, P. Zheng, Y. Luo, and Z. Huang. 2022. Apple Polyphenols Improve Intestinal Antioxidant Capacity and Barrier Function by Activating the Nrf2/Keap1 Signaling Pathway in a Pig Model. *J Agric Food Chem* 70:7576–7585.
- Huang, C. M., and T. T. Lee. 2018a. Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs-A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 31:617–627 Available at <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0657> (verified 11 January 2023).

- Huang, C. M., and T. T. Lee. 2018b. Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs — A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 31:617–627.
- Huang, Y., W. Li, Z. Yuan Su, and A. N. T. Kong. 2015. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *Journal of Nutritional Biochemistry* 26:1401–1413.
- Hug, H., M. H. Mohajeri, and G. La Fata. 2018. Toll-like receptors: Regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients* 10.
- Hussein, E. O. S., S. H. Ahmed, A. M. Abudabos, G. M. Suliman, M. E. Abd El-Hack, A. A. Swelum, and A. N. Alowaimer. 2020. Ameliorative effects of antibiotic-, probiotic- and phytobiotic-supplemented diets on the performance, intestinal health, carcass traits, and meat quality of *Clostridium perfringens*-infected broilers. *Animals* 10.
- Hussein, E. O. S., G. M. Suliman, A. M. Abudabos, A. N. Alowaimer, S. H. Ahmed, M. E. Abd El-Hack, M. Alagawany, A. A. Swelum, A. Tinelli, V. Tufarelli, and V. Laudadio. 2019. Effect of a low-energy and enzyme-supplemented diet on broiler chicken growth, carcass traits and meat quality. *Arch. Anim. Breed* 62:297–304 Available at <https://doi.org/10.5194/aab-62-297-2019> (verified 16 February 2023).
- Inoki, K., T. Zhu, and K. L. Guan. 2003. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115:577–590.
- Irawan, A., C. Hidayat, A. Jayanegara, and A. Ratriyanto. 2021. Essential oils as growth-promoting additives on performance, nutrient digestibility, cecal microbes, and serum metabolites of broiler chickens: A meta-analysis. *Anim Biosci* 34:1499–1513.
- Jeuken, A., B. J. G. Keser, E. Khan, A. Brouwer, J. Koeman, and M. S. Denison. 2003. Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *J Agric Food Chem* 51:5478–5487.
- Jha, R., R. Das, S. Oak, and P. Mishra. 2020. Probiotics (Direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. *Animals* 10:1–19.

- Jhanwar-Uniyal, M., J. v. Wainwright, A. L. Mohan, M. E. Tobias, R. Murali, C. D. Gandhi, and M. H. Schmidt. 2019. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul* 72:51–62.
- Jiang, S. Z., Z. Li, G. Y. Wang, Z. B. Yang, W. R. Yang, G. G. Zhang, and Y. B. Wu. 2014. Effects of *Fusarium* mycotoxins with yeast cell wall absorbent on hematology, serum biochemistry, and oxidative stress in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 23:165–173.
- Jie, H., L. Lian, L. J. Qu, J. X. Zheng, Z. C. Hou, G. Y. Xu, J. Z. Song, and N. Yang. 2013. Differential expression of Toll-like receptor genes in lymphoid tissues between Marek's disease virus-infected and noninfected chickens. *Poult Sci* 92:645–654.
- Jung, K. A., and M. K. Kwak. 2010. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15:7266–7291.
- Kapelyukh, Y., C. J. Henderson, N. Scheer, A. Rode, and C. R. Wolf. 2019. Defining the contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to drug metabolism using humanized CYP1A1/1A2 and *Cyp1a1/Cyp1a2* knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition* 47:907–918.
- Karásková, K., P. Suchý, and E. Straková. 2015. Current use of phytogetic feed additives in animal nutrition: A review. *Czech Journal of Animal Science* 60:521–530.
- Karpala, A. J., J. W. Lowenthal, and A. G. Bean. 2008. Activation of the TLR3 pathway regulates IFN β production in chickens. *Dev Comp Immunol* 32:435–444.
- Kaschubek, T., E. Mayer, S. Rzesnik, B. Grenier, D. Bachinger, C. Schieder, J. König, and K. Teichmann. 2018. Effects of phytogetic feed additives on cellular oxidative stress and inflammatory reactions in intestinal porcine epithelial cells 1. *J. Anim. Sci* 96:3657–3669.
- Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19:24–32.

- Kawasaki, T., and T. Kawai. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5:461.
- Keestra, A. M., M. R. de Zoete, L. I. Bouwman, M. M. Vaezirad, and J. P. M. Van Putten. 2013. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Dev Comp Immunol* 41:316–323.
- Kennedy, C., and K. Tierney. 2012. Xenobiotic Protection/Resistance Mechanisms in Organisms. Pages 12293–12314 in *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer New York.
- Kikusato, M. 2021. Phytobiotics to improve health and production of broiler chickens: functions beyond the antioxidant activity. *Anim Biosci* 34:345–353 Available at www.animbiosci.org (verified 30 November 2022).
- Kikusato, M., G. Xue, A. Pastor, T. A. Niewold, and M. Toyomizu. 2021. Effects of plant-derived isoquinoline alkaloids on growth performance and intestinal function of broiler chickens under heat stress. *Poult Sci* 100:957–963.
- Kim, W. H., H. S. Lillehoj, and W. Min. 2019. Indole Treatment Alleviates Intestinal Tissue Damage Induced by Chicken Coccidiosis Through Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org 1:560 Available at www.frontiersin.org (verified 28 November 2022).
- Kogut, M. H., H. I. Chiang, C. L. Swaggerty, I. Y. Pevzner, and H. Zhou. 2012. Gene expression analysis of Toll-like receptor pathways in heterophils from genetic chicken lines that differ in their susceptibility to *Salmonella enteritidis*. *Front Genet* 3:121.
- Köhle, C., and K. W. Bock. 2006. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 72:795–805.
- Kolawole, O., A. Graham, C. Donaldson, B. Owens, W. A. Abia, J. Meneely, M. J. Alcorn, L. Connolly, and C. T. Elliott. 2020. Low Doses of Mycotoxin Mixtures below EU Regulatory Limits Can Negatively Affect the Performance of Broiler Chickens: A Longitudinal Study. *Toxins (Basel)* 12:433 Available at www.mdpi.com/journal/toxins (verified 20 December 2022).

- Koseli, E., N. Seyidoglu, R. Gurbanli, and C. Aydin. 2022. The influence of phytogetic additive on the antioxidant capacity, immunity and liver functions in stress-induced male rats. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 73:4449–4458.
- Kostyuk, S. V., L. N. Porokhovnik, E. S. Ershova, E. M. Malinovskaya, M. S. Konkova, L. V. Kameneva, O. A. Dolgikh, V. P. Veiko, V. M. Pisarev, A. V. Martynov, V. A. Sergeeva, A. A. Kaliyanov, A. D. Filev, J. M. Chudakova, M. S. Abramova, S. I. Kutsev, V. L. Izhevskaya, and N. N. Veiko. 2018. Changes of KEAP1/NRF2 and IKB/NF- κ B Expression Levels Induced by Cell-Free DNA in Different Cell Types. *Oxid Med Cell Longev* 2018 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29743966/> (verified 8 March 2023).
- Kouzounis, D., J. G. Kers, N. Soares, H. Smidt, M. A. Kabel, and H. A. Schols. 2022. Cereal type and combined xylanase/glucanase supplementation influence the cecal microbiota composition in broilers. *J Anim Sci Biotechnol* 13.
- Kozieł, M. J., M. Ziaja, and A. W. Piastowska-Ciesielska. 2021. Intestinal barrier, claudins and mycotoxins. *Toxins (Basel)* 13.
- Kraft, S., L. Buchenauer, and T. Polte. 2021. Mold, mycotoxins and a dysregulated immune system: A combination of concern? *Int J Mol Sci* 22.
- Krauze, M. 2021. Phytobiotics, a Natural Growth Promoter for Poultry.
- Krauze, M., M. Cendrowska-Pinkosz, P. Matusevičius, A. Stępniewska, P. Jurczak, and K. Ognik. 2021. The effect of administration of a phytobiotic containing cinnamon oil and citric acid on the metabolism, immunity, and growth performance of broiler chickens. *Animals* 11:1–19.
- Lagerström, M. C., A. R. Hellström, D. E. Gloriam, T. P. Larsson, H. B. Schiöth, and R. Fredriksson. 2006. The G Protein–Coupled Receptor Subset of the Chicken Genome. *PLoS Comput Biol* 2:e54 Available at <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.0020054> (verified 8 March 2023).
- Laplane, M., and D. M. Sabatini. 2012. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293.

- Laudadio, V., L. Passantino, A. Perillo, G. Lopresti, A. Passantino, R. U. Khan, and V. Tufarelli. 2012. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poult Sci* 91:265–270.
- Lee, J., and S. E. Aggrey. 2016. Transcriptomic differences of genes in the avian target of rapamycin (avTOR) pathway in a divergent line of meat-type chickens selected for feed efficiency. Available at <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027120> (verified 14 November 2022).
- Lee, J. W., D. H. Kim, Y. B. Kim, S. B. Jeong, S. T. Oh, S. Y. Cho, and K. W. Lee. 2020. Dietary encapsulated essential oils improve production performance of coccidiosis-vaccine-challenged broiler chickens. *Animals* 10.
- Lee, M. T., W. C. Lin, B. Yu, and T. T. Lee. 2016. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals - A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 30:299–308.
- Lee, B., K. M. Moon, and C. Y. Kim. 2018a. Tight junction in the intestinal epithelium: Its association with diseases and regulation by phytochemicals. *J Immunol Res* 2018.
- Lee, H. J., M. C. Pyo, H. S. Shin, D. Ryu, and K. W. Lee. 2018b. Renal toxicity through AhR, PXR, and Nrf2 signaling pathway activation of ochratoxin A-induced oxidative stress in kidney cells. *Food and Chemical Toxicology* 122:59–68.
- Li, K., Z. Cao, Y. Guo, C. Tong, S. Yang, M. Long, P. Li, and J. He. 2020. Selenium Yeast Alleviates Ochratoxin A-Induced Apoptosis and Oxidative Stress via Modulation of the PI3K/AKT and Nrf2/Keap1 Signaling Pathways in the Kidneys of Chickens. Available at <https://doi.org/10.1155/2020/4048706> (verified 30 December 2022).
- Li, T., M. Shen, R. Hou, L. Zhang, L. Huang, P. Guo, P. Wu, and G. Zhao. 2022. Effects of phytogenic feed on productive performance, egg quality, antioxidant activity and lipid metabolism of laying hens. *J Anim Feed Sci* Available at <http://www.jafs.com.pl/Effects-of-phytogenic-feed-on-productive-performance-negg-quality-antioxidant-activity,154977,0,2.html>.

- Li, X., P. Zhang, X. Jiang, H. Du, C. Yang, Z. Zhang, S. Men, Z. Zhang, W. Jiang, and H. Wang. 2017. Differences in expression of genes in the MyD88 and TRIF signalling pathways and methylation of TLR4 and TRIF in Tibetan chickens and DaHeng S03 chickens infected with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 189:28–35.
- Liang, D., F. Li, Y. Fu, Y. Cao, X. Song, T. Wang, W. Wang, M. Guo, E. Zhou, D. Li, Z. Yang, and N. Zhang. 2014. Thymol Inhibits LPS-Stimulated Inflammatory Response via Down-Regulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in Mouse Mammary Epithelial Cells. *Inflammation* 37:214–222.
- Liang, W., H. Li, H. Zhou, M. Wang, X. Zhao, X. Sun, C. Li, and X. Zhang. 2021. Effects of *Taraxacum* and *Astragalus* extracts combined with probiotic *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* on *Escherichia coli*-infected broiler chickens. *Poult Sci* 100.
- Liu, J. D., B. Doupovec, D. Schatzmayr, G. R. Murugesan, C. Bortoluzzi, A. M. Villegas, and T. J. Applegate. 2020a. The impact of deoxynivalenol, fumonisins, and their combination on performance, nutrient, and energy digestibility in broiler chickens. *Poult Sci* 99:272–279.
- Liu, X., X. Lin, S. Zhang, C. Guo, J. Li, Y. Mi, and C. Zhang. 2018a. Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Aging (Albany NY)* 10:2016 Available at [/pmc/articles/PMC6128425/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34128425/) (verified 1 December 2022).
- Liu, L., M. Ren, K. Ren, Y. Jin, and M. Yan. 2020b. Heat stress impacts on broiler performance: a systematic review and meta-analysis. *Poult Sci* 99:6205–6211.
- Liu, Y., M. Song, T. M. Che, J. J. Lee, D. Bravo, C. W. Maddox, and J. E. Pettigrew. 2014. Dietary plant extracts modulate gene expression profiles in ileal mucosa of weaned pigs after an *Escherichia coli* infection. *J Anim Sci* 92:2050–2062.
- Liu, S. D., M. H. Song, W. Yun, J. H. Lee, H. B. Kim, and J. H. Cho. 2019a. Effect of carvacrol essential oils on immune response and inflammation-related genes expression in broilers challenged by lipopolysaccharide. *Poult Sci* 98:2026–2033.

- Liu, S. D., M. H. Song, W. Yun, J. H. Lee, C. H. Lee, W. G. Kwak, N. S. Han, H. B. Kim, and J. H. Cho. 2018b. Effects of oral administration of different dosages of carvacrol essential oils on intestinal barrier function in broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 102:1257–1265.
- Liu, Y., and W. Wang. 2016. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Animal Science Journal* 87:1490–1500 Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.12550> (verified 30 December 2022).
- Liu, Q., J. Wen, J. Zhu, T. Zhang, Y. Deng, and J. Jiang. 2019b. Aromatic hydrocarbon receptor regulates chicken cytochrome P450 1A5 transcription: A novel insight into T-2 toxin-induced gene expression and cytotoxicity in LMH cells. *Biochem Pharmacol* 168:319–329.
- Livingston, M. L., A. J. Cowieson, R. Crespo, V. Hoang, B. Nogal, M. Browning, and K. A. Livingston. 2020. Effect of broiler genetics, age, and gender on performance and blood chemistry. *Heliyon* 6.
- Lu, H., S. A. Adedokun, L. Adeola, and K. M. Ajuwon. 2014. Anti-inflammatory effects of non-antibiotic alternatives in coccidia challenged broiler chickens. *Journal of Poultry Science* 51:14–21.
- Lu, M. C., J. A. Ji, Z. Y. Jiang, and Q. D. You. 2016. The Keap1–Nrf2–ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev* 36:924–963.
- Lu, Y., A. J. Sarson, J. Gong, H. Zhou, W. Zhu, Z. Kang, H. Yu, S. Sharif, and Y. Han. 2009. Expression profiles of genes in toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. *Clinical and Vaccine Immunology* 16:1639–1647.
- Lucke, A., J. Böhm, Q. Zebeli, B. U. Metzler-Zebeli, M. Sharma, M. Hollmann, A. Wild, B. Dockner, and G. Doupovec. 2018. Dietary deoxynivalenol and oral lipopolysaccharide challenge differently affect intestinal innate immune response and barrier function in broiler chickens 1. *J Anim Sci* 96:5134–5143 Available at

<https://academic.oup.com/jas/advance-article-abstract/doi/10.1093/jas/sky379/5115711>.

- Lyons, C. L., and H. M. Roche. 2018. Nutritional modulation of AMPK-impact upon metabolic-inflammation. *Int J Mol Sci* 19.
- Ma, Q. 2013. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:401–426.
- Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. P. Pandolfi. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121:179–193.
- De Maesschalck, C., V. Eeckhaut, L. Maertens, L. De Lange, L. Marchal, C. Nezer, S. De Baere, S. Croubels, G. Daube, J. Dewulf, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, B. Taminau, and F. Van Immerseel. 2015. Effects of Xylo-oligosaccharides on broiler chicken performance and microbiota. *Appl Environ Microbiol* 81:5880–5888.
- Manafi, M., and H. Khosravinia. 2013. Effects of Aflatoxin on the Performance of Broiler Breeders and Its Alleviation through Herbal Mycotoxin Binder. *J. Agr. Sci. Tech* 15:55–63.
- Mansilla, W. D., J. Moreno-Rubio, F. Sevillano-Quintero, S. Saraswathy, and A. I. García-Ruiz. 2022. The effect of gradually decreasing the dietary energy content, at constant or increased lysine:energy ratio on broiler performance, carcass yield, and body composition. *Poult Sci* 101.
- Manzella, C. R., M. Ackerman, M. Singhal, A. L. Ticho, J. Ceh, W. A. Alrefai, S. Saksena, P. K. Dudeja, and R. K. Gill. 2020. Serotonin modulates AhR activation by interfering with CYP1A1-mediated clearance of AhR ligands. *Cellular Physiology and Biochemistry* 54:126–141.
- Marchand, A., R. Barouki, and M. Garlatti. 2004. Regulation of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Gene Expression by CYP1A1 Activity.
- Marcinčáková, D., M. Čertík, S. Marcinčák, P. Popelka, J. Šimková, T. Klempová, V. Petrovič, M. Tučková, and M. Bača. 2016. 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 Available at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjas20> (verified 14 November 2022).
- Marin, D. E., G. C. Pistol, M. A. Gras, M. L. Palade, and I. Taranu. 2017. Comparative effect of ochratoxin A on inflammation and oxidative stress parameters in gut and kidney of piglets. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 89:224–231.
- Mason, E. F., and J. C. Rathmell. 2011. Cell metabolism: An essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1813:645–654.
- Mattioli, S., A. Dal Bosco, S. Ruggeri, M. Martino, L. Moscati, C. Pesca, and C. Castellini. 2017. Adaptive response to exercise of fast-growing and slow-growing chicken strains: Blood oxidative status and non-enzymatic antioxidant defense. *Poult Sci* 96:4096–4102.
- Mayangsari, Y., and T. Suzuki. 2018. Resveratrol Ameliorates Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice and Intestinal Cells. *J Agric Food Chem* 66:12666–12674.
- Mehdi, Y., M. P. Létourneau-Montminy, M. Lou Gaucher, Y. Chorfi, G. Suresh, T. Rouissi, S. K. Brar, C. Côté, A. A. Ramirez, and S. Godbout. 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition* 4:170–178.
- Michiels, J., J. Missotten, N. 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 tract of piglets. *J Sci Food Agric* 88:2371–2381 Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.3358> (verified 8 March 2023).
- Moharreri, M., R. Vakili, E. Oskoueian, and G. Rajabzadeh. 2022. Effects of microencapsulated essential oils on growth performance and biomarkers of

- inflammation in broiler chickens challenged with salmonella enteritidis. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 21:349–357.
- Moi, P., K. Chant, I. Asunis, A. Cao, Y. W. Kant, and Y. W. Kan. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the f-globin locus control region.
- Mountzouris, K. C., V. V. Paraskeuas, and K. Fegeros. 2020. Priming of intestinal cytoprotective genes and antioxidant capacity by dietary phytogetic inclusion in broilers. *Animal Nutrition* 6:305–312.
- Mountzouris, K. C., V. V. Paraskeuas, E. Griela, K. C. Mountzouris, V. V. Paraskeuas, and E. Griela. 2022. Adaptive Poultry Gut Capacity to Resist Oxidative Stress. :243–262 Available at https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-90303-9_12 (verified 14 March 2023).
- Mountzouris, K. C., V. Paraskeuas, E. Griela, G. Papadomichelakis, and K. Fegeros. 2019. Effects of phytogetic inclusion level on broiler carcass yield, meat antioxidant capacity, availability of dietary energy, and expression of intestinal genes relevant for nutrient absorptive and cell growth-protein synthesis metabolic functions. *Anim Prod Sci* 60.
- Mountzouris, K. C., V. Paraskeuas, P. Tsirtsikos, I. Palamidi, T. Steiner, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2011. Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Anim Feed Sci Technol* 168:223–231.
- Mueller, K., N. M. Blum, H. Kluge, and A. S. Mueller. 2012. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 108:588–602.
- Muhammad, I., X. Sun, H. Wang, W. Li, X. Wang, P. Cheng, S. Li, and S. Hamid. 2017. Curcumin Successfully Inhibited the Computationally Identified CYP2A6 Enzyme-Mediated Bioactivation of Aflatoxin B1 in Arbor Acres broiler. 8:143 Available at www.frontiersin.org (verified 28 November 2022).

- Muri, J., S. Heer, M. Matsushita, L. Pohlmeier, L. Tortola, T. Fuhrer, M. Conrad, N. Zamboni, J. Kisielow, and M. Kopf. 2018. The thioredoxin-1 system is essential for fueling DNA synthesis during T-cell metabolic reprogramming and proliferation. *Nat Commun* 9.
- Nawaz, A. H., K. Amoah, Q. Y. Leng, J. H. Zheng, W. L. Zhang, and L. Zhang. 2021. Poultry Response to Heat Stress: Its Physiological, Metabolic, and Genetic Implications on Meat Production and Quality Including Strategies to Improve Broiler Production in a Warming World. *Front Vet Sci* 8.
- Nigam, Y., and N. Williams. 2019. Gastrointestinal tract 4: anatomy and role of the jejunum and ileum. *Nurs Times* 115:43–46.
- Noureldein, M. H., and A. A. Eid. 2018. Gut microbiota and mTOR signaling: Insight on a new pathophysiological interaction. *Microb Pathog* 118:98–104.
- Novie Andri, S., I. Ismoyowati, W. Rahayu, W. Yusmi Nur, and A. Vony. 2022. Broiler Performance on Different Housing Condition: A Case Study on Integration Company-Farm Broiler Farming in Kebumen Regency.
- Ochieng, P. E., M. L. Scippo, D. C. Kemboi, S. Croubels, S. Okoth, E. K. Kang'ethe, B. Doupovec, J. K. Gathumbi, J. F. Lindahl, and G. Antonissen. 2021. Mycotoxins in poultry feed and feed ingredients from sub-saharan africa and their impact on the production of broiler and layer chickens: A review. *Toxins (Basel)* 13.
- Ogbuewu, I. P., M. Mabelebele, N. A. Sebola, and C. Mbajiorgu. 2022. Bacillus Probiotics as Alternatives to In-feed Antibiotics and Its Influence on Growth, Serum Chemistry, Antioxidant Status, Intestinal Histomorphology, and Lesion Scores in Disease-Challenged Broiler Chickens. *Front Vet Sci* 9.
- Oloyo, A., and A. Ojerinde. 2019. Poultry Housing and Management.in *Poultry*.
- Özcan, Z., G. Gül, and I. Yaman. 2015. Ochratoxin A activates opposing c-MET/PI3K/Akt and MAPK/ ERK 1-2 pathways in human proximal tubule HK-2 cells. *Arch Toxicol* 3:1313–1327.
- Özören, N., and W. S. El-Deiry. 2003. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells.

- Panee, C., I. Chandhane, and L. Wacharee. 2014. Antiinflammatory effects of essential oil from the leaves of *Cinnamomum cassia* and cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated J774A.1 cells. *J Adv Pharm Technol Res* 5:164–170.
- Paraskeuas, V., K. Fegeros, C. Hunger, G. Theodorou, and K. C. Mountzouris. 2017a. 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., K. Fegeros, I. Palamidi, C. Hunger, and K. C. Mountzouris. 2017b. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different phytogenic levels. *Animal Nutrition* 3:114–120.
- 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. *Journal of Poultry Science* 53:264–273.
- Paraskeuas, V., and K. C. Mountzouris. 2019a. Broiler gut microbiota and expressions of gut barrier genes affected by cereal type and phytogenic inclusion. *Animal Nutrition* 5:22–31.
- Paraskeuas, V. V., and K. C. Mountzouris. 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* 98:2220–2230.
- te Pas, M. F. W., R. Borg, N. J. H. Buddiger, B. J. Wood, J. M. J. Rebel, M. M. van Krimpen, M. P. L. Calus, J. E. Park, and D. Schokker. 2020. Regulating appetite in broilers for improving body and muscle development – A review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 104:1819–1834.
- Patel, D. K., and D. Jyoti Sen. 2013. Xenobiotics: An Essential Precursor for Living System. *Am J Adv Drug Deliv* 1:262–270 Available at www.ajadd.co.uk (verified 27 November 2022).

- Patel, B. P., A. Safdar, S. Raha, M. A. Tarnopolsky, and M. J. Hamadeh. 2010. Caloric Restriction Shortens Lifespan through an Increase in Lipid Peroxidation, Inflammation and Apoptosis in the G93A Mouse, an Animal Model of ALS. *PLoS One* 5:9386 Available at <http://www.cihh.ca> (verified 14 November 2022).
- Patterson, A. D., F. J. Gonzalez, and J. R. Idle. 2010. Xenobiotic metabolism: A view through the metabolometer. *Chem Res Toxicol* 23:851–860 Available at <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx100020p> (verified 27 November 2022).
- Pearlin, B. V., S. Muthuvel, P. Govidasamy, M. Villavan, M. Alagawany, M. Ragab Farag, K. Dhama, and M. Gopi. 2020. Role of acidifiers in livestock nutrition and health: A review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 104:558–569.
- Pernomian, L., M. Duarte-Silva, and C. R. de Barros Cardoso. 2020. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) as a Potential Target for the Control of Intestinal Inflammation: Insights from an Immune and Bacteria Sensor Receptor. *Clin Rev Allergy Immunol* 59:382–390.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pham, V. H., W. Abbas, J. Huang, Q. He, W. Zhen, Y. Guo, and Z. Wang. 2022. Effect of blending encapsulated essential oils and organic acids as an antibiotic growth promoter alternative on growth performance and intestinal health in broilers with necrotic enteritis. *Poult Sci* 101.
- Pinto, C. J. G., M. Á. Ávila-Gálvez, Y. Lian, P. Moura-Alves, and C. Nunes dos Santos. 2023. Targeting the aryl hydrocarbon receptor by gut phenolic metabolites: A strategy towards gut inflammation. *Redox Biol* 61.
- Piotrowska, M., M. Swierczynski, J. Fichna, and A. Piechota-Polanczyk. 2021. The Nrf2 in the pathophysiology of the intestine: Molecular mechanisms and therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Res* 163.
- Pizzino, G., N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, and A. Bitto. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Available at <https://doi.org/10.1155/2017/8416763> (verified 13 November 2022).

- Proszkowiec-Weglarz, M., L. L. Schreier, S. Kahl, K. B. Miska, B. Russell, and T. H. Elsasser. 2020. Effect of delayed feeding post-hatch on expression of tight junction– and gut barrier–related genes in the small intestine of broiler chickens during neonatal development. *Poult Sci* 99:4714–4729.
- Quinteiro-Filho, W. M., A. S. Calefi, D. S. G. Cruz, T. P. A. Aloia, A. Zager, C. S. Astolfi-Ferreira, J. A. Piantino Ferreira, S. Sharif, and J. Palermo-Neto. 2017. Heat stress decreases expression of the cytokines, avian β -defensins 4 and 6 and Toll-like receptor 2 in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol* 186:19–28.
- Radulovic, S., D. Sefer, Z. Jokic, R. Markovic, D. Peric, and M. Lukic. 2021. Restrictive nutrition and compensatory growth of broilers: Impact on growth production results and carcass characteristics. in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing Ltd.
- Rajput, S. A., L. Sun, N.-Y. Zhang, M. M. Khalil, Z. Ling, L. Chong, S. Wang, I. R. Rajput, D. M. Bloch, F. A. Khan, A. Shaukat, and D. Qi. 2019. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Alleviates AflatoxinB 1-Induced Immunotoxicity and Oxidative Stress via Modulation of NF- κ B and Nrf2 Signaling Pathways in Broilers. *Toxins (Basel)* 11:23 Available at www.mdpi.com/journal/toxins (verified 30 November 2022).
- Ravindran, V., and M. Reza Abdollahi. 2021. Nutrition and digestive physiology of the broiler chick: State of the art and outlook. *Animals* 11.
- Reece, W., and E. Rowe. 2017. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. 5th ed. Wiley Blackwell, Hoboken, NJ.
- Riahi, I., V. Marquis, A. J. Ramos, J. Brufau, E. Esteve-Garcia, and A. M. Pérez-Vendrell. 2020. Effects of deoxynivalenol-contaminated diets on productive, morphological, and physiological indicators in broiler chickens. *Animals* 10:1–11.
- Rose, E. C., J. Odle, A. T. Blikslager, and A. L. Ziegler. 2021. Probiotics, prebiotics and epithelial tight junctions: A promising approach to modulate intestinal barrier function. *Int J Mol Sci* 22.

- Ross, D., and D. Siegel. 2017. Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Front Physiol* 8.
- Rosseland, C. M., L. Wierød, L. I. Flinder, M. P. Oksvold, E. Skarpen, and H. S. Huitfeldt. 2008. Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K. *J Cell Physiol* 215:818–826 Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.21367> (verified 14 November 2022).
- Safe, S., A. Jayaraman, and R. S. Chapkin. 2020. Ah receptor ligands and their impacts on gut resilience: structure–activity effects. *Crit Rev Toxicol* 50:463–473.
- Sahin, K., C. Orhan, M. O. Smith, and N. Sahin. 2013. Molecular targets of dietary phytochemicals for the alleviation of heat stress in poultry. *Worlds Poult Sci J* 69:113–123.
- Sahin, K., C. Orhan, Z. Tuzcu, M. Tuzcu, and N. Sahin. 2012. Curcumin ameliorates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail. *Food and Chemical Toxicology* 50:4035–4041.
- Salaun, B., P. Romero, and S. Lebecque. 2007. Toll-like receptor’s two-edged sword: When immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 37:3311–3318.
- De Santis, M. C., L. Gozzelino, J. P. Margaria, A. Costamagna, E. Ratto, F. Gulluni, E. Di Gregorio, E. Mina, N. Lorito, M. Bacci, R. Lattanzio, G. Sala, P. Cappello, F. Novelli, E. Giovannetti, C. Vicentini, S. Andreani, P. Delfino, V. Corbo, A. Scarpa, P. E. Porporato, A. Morandi, E. Hirsch, and M. Martini. 2023. Lysosomal lipid switch sensitises to nutrient deprivation and mTOR targeting in pancreatic cancer. *Gut* 72:360–371.
- Santos, R. R., and E. van Eerden. 2021. Impaired Performance of Broiler Chickens Fed Diets Naturally Contaminated with Moderate Levels of Deoxynivalenol. *Toxins (Basel)* 13.

- Santos, R. R., F. C. Velkers, J. C. M. Vernooij, L. Star, J. L. T. Heerkens, J. van Harn, and I. C. de Jong. 2022. Nutritional interventions to support broiler chickens during *Eimeria* infection. *Poult Sci* 101.
- Semin, I., J. Ninnemann, M. Bondareva, I. Gimaev, and A. A. Kruglov. 2021. Interplay Between Microbiota, Toll-Like Receptors and Cytokines for the Maintenance of Epithelial Barrier Integrity. *Front Med (Lausanne)* 8.
- Shah, B. R., W. Xu, and J. Mraz. 2019. Cytochrome P450 1B1: Role in health and disease and effect of nutrition on its expression. *RSC Adv* 9:21050–21062.
- Shang, Q. H., Z. B. Yang, W. R. Yang, Z. Li, G. G. Zhang, and S. Z. Jiang. 2016. Toxicity of mycotoxins from contaminated corn with or without yeast cell wall adsorbent on broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* 29:674–680.
- Shanmugasundaram, R., D. Adams, S. Ramirez, G. R. Murugesan, T. J. Applegate, S. Cunningham, A. Pokoo-Aikins, and A. E. Glenn. 2022. Subclinical Doses of Combined Fumonisin and Deoxynivalenol Predispose *Clostridium perfringens*-Inoculated Broilers to Necrotic Enteritis. *Front Physiol* 13.
- Shin, S., N. Wakabayashi, V. Misra, S. Biswal, G. H. Lee, E. S. Agoston, M. Yamamoto, and T. W. Kensler. 2007. NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis. *Mol Cell Biol* 27:7188–7197.
- Da Silva, E. O., A. P. F. L. Bracarense, and I. P. Oswald. 2018. Mycotoxins and oxidative stress: Where are we? *World Mycotoxin J* 11:113–133.
- Singh, R., S. Chandrashekarappa, S. R. Bodduluri, B. V. Baby, B. Hegde, N. G. Kotla, A. A. Hiwale, T. Saiyed, P. Patel, M. Vijay-Kumar, M. G. I. Langille, G. M. Douglas, X. Cheng, E. C. Rouchka, S. J. Waigel, G. W. Dryden, H. Alatassi, H. G. Zhang, B. Haribabu, P. K. Vemula, and V. R. Jala. 2019. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat Commun* 10.
- Song, Z. H., K. Cheng, X. C. Zheng, H. Ahmad, L. L. Zhang, and T. Wang. 2018. Effects of dietary supplementation with enzymatically treated *Artemisia annua* on growth performance, intestinal morphology, digestive enzyme activities,

- immunity, and antioxidant capacity of heat-stressed broilers. *Poult Sci* 97:430–437.
- Sousa, M. C. S., G. M. Galli, N. B. Bottari, D. F. Alba, K. W. Leal, T. F. Lopes, L. Druzian, M. R. C. Schetinger, E. M. Gloria, R. E. Mendes, L. M. Stefani, and A. S. Da Silva. 2020. Fumonisin-(*Fusarium verticillioides*)-contaminated feed causes hepatic oxidative stress and negatively affects broiler performance in the early stage: Does supplementation with açai flour residues (*Euterpe oleracea*) minimize these problems? *Microb Pathog* 146.
- Stamilla, A., A. Messina, S. Sallemi, L. Condorelli, F. Antoci, R. Puleio, G. R. Loria, G. Cascone, and M. Lanza. 2020. Effects of microencapsulated blends of organics acids (OA) and essential oils (EO) as a feed additive for broiler chicken. a focus on growth performance, gut morphology and microbiology. *Animals* 10.
- Stefanello, C., D. P. Rosa, Y. K. Dalmoro, A. L. Segatto, M. S. Vieira, M. L. Moraes, and E. Santin. 2020. Protected Blend of Organic Acids and Essential Oils Improves Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Intestinal Health of Broiler Chickens Undergoing an Intestinal Challenge. *Front Vet Sci* 6.
- Stefanson, A. L., and M. Bakovic. 2014. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: Focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients* 6:3777–3801.
- Stolfi, C., C. Maresca, G. Monteleone, and F. Laudisi. 2022. Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases. *Biomedicines* 10.
- Sun, L., G. Xu, Y. Dong, M. Li, L. Yang, and W. Lu. 2020. Quercetin Protects against Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Oxidative Stress in Broiler Chickens through Activation of Nrf2 Pathway. *Molecules* 25:1053 Available at www.mdpi.com/journal/molecules (verified 30 November 2022).
- Suzuki, T., and H. Hara. 2009. Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonnula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in caco-2 cells. *Journal of Nutrition* 139:965–974.
- Suzuki, H., and A. Yanaka. 2018. Oxidative Stress and Digestive Diseases. *J. Clin. Biochem. Nutr* 63:18–25.

- Taleb, Z., A. A. Sadeghi, P. Shawrang, M. Chamani, and M. Aminafshar. 2017. Effect of energy levels and sources on the blood attributes and immune response in broiler chickens exposed to heat stress. *Journal of Livestock Science* 8:52–58.
- Tang, L. P., Y. L. Liu, J. X. Zhang, K. N. Ding, M. H. Lu, and Y. M. He. 2022. Heat stress in broilers of liver injury effects of heat stress on oxidative stress and autophagy in liver of broilers. *Poult Sci* 101.
- Tavangar, P., S. Gharahveysi, V. Rezaeipour, and M. Irani. Efficacy of phytobiotic and toxin binder feed additives individually or in combination on the growth performance, blood biochemical parameters, intestinal morphology, and microbial population in broiler chickens exposed to aflatoxin B 1. Available at <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02778-0>.
- Teirlynck, E., L. Bjerrum, V. Eeckhaut, G. Huygebaert, F. Pasmans, F. Haesebrouck, J. Dewulf, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2009. The cereal type in feed influences gut wall morphology and intestinal immune cell infiltration in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 102:1453–1461.
- Tomaszewska, E., H. Rudyk, P. Dobrowolski, J. Donaldson, I. Świetlicka, I. Puzio, D. Kamiński, D. Wiacek, V. Kushnir, O. Brezryn, V. Muzyka, R. Doraczyńska, S. Muszyński, and I. Kotsyumbas. 2021. Changes in the intestinal histomorphometry, the expression of intestinal tight junction proteins, and the bone structure and liver of pre-laying hens following oral administration of fumonisins for 21 days. *Toxins (Basel)* 13.
- Tong, C., P. Li, L. H. Yu, L. Li, K. Li, Y. Chen, S. H. Yang, and M. Long. 2020. Selenium-rich yeast attenuates ochratoxin A-induced small intestinal injury in broiler chickens by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NF-KB activation. *J Funct Foods* 66.
- Tufarelli, V., M. Elsabagh, Y. A. Soltan, D. Ibrahim, A. H. Sewid, A. H. Arisha, A. H. Abd El-Fattah, A. M. Abdelaziz, O. A. Al-Jabr, and A. T. Y. Kishawy. 2020. Influence of *Glycyrrhiza glabra* Extract on Growth, Gene Expression of Gut Integrity, and *Campylobacter jejuni* Colonization in Broiler Chickens. *Front Vet Sci* 7:612063 Available at www.frontiersin.org (verified 11 December 2022).

- Vaish, S., · Divya Gupta, R. Mehrotra, S. Mehrotra, and M. K. Basantani. 2020. Glutathione S-transferase: a versatile protein family. *3 Biotech* 10:321 Available at <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02312-3> (verified 27 November 2022).
- Vanessa Valenzuela-Grijalva, N., A. Pinelli-Saavedra, A. Muhlia-Almazan, D. Domínguez-Díaz, and H. González-Ríos. 2017. Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *J Anim Sci Technol* 59:8.
- Vogeley, C., C. Esser, T. Tüting, J. Krutmann, and T. Haarmann-Stemmann. 2019. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Environmentally Induced Skin Aging and Skin Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 20:6005 Available at www.mdpi.com/journal/ijms (verified 23 November 2022).
- Vomund, S., A. Schäfer, M. J. Parnham, B. Brüne, and A. Von Knethen. 2017. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *Int J Mol Sci* 18.
- Wan, S., N. Sun, H. Li, A. Khan, X. Zheng, Y. Sun, and R. Fan. 2022a. Deoxynivalenol damages the intestinal barrier and biota of the broiler chickens. *BMC Vet Res* 18.
- Wan, Y. D., R. X. Zhu, Z. Z. Bian, and X. T. Pan. 2022b. Improvement of Gut Microbiota by Inhibition of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway in Rats with Severe Acute Pancreatitis. *Medical Science Monitor* 28.
- Wang, R. J., S. X. Fui, C. H. Miao, and D. Y. Feng. 2006. Effects of Different Mycotoxin Adsorbents on Performance, Meat Characteristics and Blood Profiles of Avian Broilers Fed Mold Contaminated Corn. *Asian-Australas J Anim Sci* 19:72–79 Available at https://www.animbiosci.org/upload/pdf/19_13.pdf (verified 20 December 2022).
- Wang, J., C. Han, Z. Lu, P. Ge, Y. Cui, D. Zhao, X. Yang, B. Wu, L. Qiang, Y. Zhang, Q. Chai, Z. Lei, L. Li, C. Hua Liu, and L. Zhang. 2020a. Simulated microgravity suppresses MAPK pathway-mediated innate immune response to bacterial infection and induces gut microbiota dysbiosis. *FASEB Journal* 34:14631–14644.

- Wang, A., and N. S. Hogan. 2019. Performance effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on broiler chickens: Influences of timing and duration of exposure. *Animal Nutrition* 5:32–40.
- Wang, H., I. Muhammad, W. Li, X. Sun, P. Cheng, and X. Zhang. 2018. Sensitivity of Arbor Acres broilers and chemoprevention of aflatoxin B1-induced liver injury by curcumin, a natural potent inducer of phase-II enzymes and Nrf2. *Environ Toxicol Pharmacol* 59:94–104.
- Wang, H., L. Pan, X. Zhang, R. Ji, L. Si, and Y. Cao. 2020b. The molecular mechanism of AhR-ARNT-XREs signaling pathway in the detoxification response induced by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ Res* 183.
- Wang, J., S. Su, C. Pender, R. Murugesan, B. Syed, and W. K. Kim. 2021. Effect of a phytogenic feed additive on growth performance, nutrient digestion, and immune response in broiler-fed diets with two different levels of crude protein. *Animals* 11:1–11.
- Weaver, A. C., W. D. King, M. Verax, U. Fox, M. B. Kudupoje, G. Mathis, B. Lumpkins, and A. Yiannikouris. 2020. Impact of Chronic Levels of Naturally Multi-Contaminated Feed with *Fusarium* Mycotoxins on Broiler Chickens and Evaluation of the Mitigation Properties of Different Titrers of Yeast Cell Wall Extract. *Toxins (Basel)* 12:636 Available at www.mdpi.com/journal/toxins (verified 20 December 2022).
- Weaver, A. C., D. M. Weaver, A. Yiannikouris, and N. Adams. 2022. Meta-analysis of the effects of mycotoxins and yeast cell wall extract supplementation on the performance, livability, and environmental sustainability of broiler production. *Poult Sci* 101.
- Wicaksono, M. A., R. Afnan, and T. Suryati. 2020. Oxidative Stress, Physiological Responses and Performance of Broilers Transported with Different Transportation Duration. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan* 8:137–143.
- Windisch, W., K. Schedle, C. Plitzner, and A. Kroismayr. 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci* 86:E140–E148

Available at https://academic.oup.com/jas/article/86/suppl_14/E140/4789896 (verified 14 November 2022).

- Wongkrasant, P., P. Pongkorpsakol, J. Ariyadamrongkwan, R. Meesomboon, S. Satitsri, R. Pichyangkura, K. E. Barrett, and C. Muanprasat. 2020. A prebiotic fructo-oligosaccharide promotes tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPK-dependent pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 129.
- Wu, J., F. Ibtisham, Y. F. Niu, Z. Wang, G. H. Li, Y. Zhao, A. Nawab, M. Xiao, and L. An. 2019. Curcumin inhibits heat-induced oxidative stress by activating the MAPK-Nrf2 / ARE signaling pathway in chicken fibroblasts cells. *J Therm Biol* 79:112–119.
- Wullaert, A., M. C. Bonnet, and M. Pasparakis. 2011. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 21:146–158.
- Xiao, R., R. F. Power, D. Mallonee, K. Routt, L. Spangler, A. J. Pescatore, A. H. Cantor, T. Ao, J. L. Pierce, and K. A. Dawson. 2012. Effects of yeast cell wall-derived mannan-oligosaccharides on jejunal gene expression in young broiler chickens. *Poult Sci* 91:1660–1669.
- Xing, C., Y. Wang, X. Dai, F. Yang, J. Luo, P. Liu, C. Zhang, H. Cao, and G. Hu. 2020. The protective effects of resveratrol on antioxidant function and the mRNA expression of inflammatory cytokines in the ovaries of hens with fatty liver hemorrhagic syndrome. *Poult Sci* 99:1019–1027.
- Yang, C., M. A. K. Chowdhury, Y. Hou, and J. Gong. 2015. Phytogetic Compounds as Alternatives to In-Feed Antibiotics: Potentials and Challenges in Application. 4:137–156 Available at www.mdpi.com/journal/pathogens (verified 28 January 2023).
- Yang, J., J. Nie, X. Ma, Y. Wei, Y. Peng, and X. Wei. 2019. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 18:26.
- Yang, C., G. Song, and W. Lim. 2020. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. Available at <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122087> (verified 1 March 2023).

- Yang, X., H. Xin, C. Yang, and X. Yang. 2018. Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive functions and immunity of broiler chickens. *Animal Nutrition* 4:388–393.
- Yasui, T., E. Y. Kim, H. Iwata, D. G. Franks, S. I. Karchner, M. E. Hahn, and S. Tanabe. 2007. Functional characterization and evolutionary history of two aryl hydrocarbon receptor isoforms (AhR1 and AhR2) from avian species. *Toxicological Sciences* 99:101–117.
- Ye, W., R. Chen, X. Chen, B. Huang, R. Lin, X. Xie, J. Chen, J. Jiang, Y. Deng, and J. Wen. 2019. AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1. *FEBS Journal* 286:4215–4231.
- Younus H. 2018. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)* 12:88–93.
- Yunus, A. W., K. Ghareeb, M. Twaruzek, J. Grajewski, and J. Böhm. 2012. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Effects on bird performance and response to common vaccines. *Poult Sci* 91:844–851.
- Zainal, T. A., T. D. Oberley, D. B. Allison, L. I. Szweda, and R. Weindruch. 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J* 14:1825–1836 Available at <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.99-0881com> (verified 8 March 2023).
- Zhang, J. F., K. W. Bai, W. P. Su, A. A. Wang, L. L. Zhang, K. H. Huang, and T. Wang. 2018. Curcumin attenuates heat-stress-induced oxidant damage by simultaneous activation of GSH-related antioxidant enzymes and Nrf2-mediated phase II detoxifying enzyme systems in broiler chickens. *Poult Sci* 97:1209–1219.
- Zhang, H., D. Li, L. Liu, Y. Liu, L. Xu, M. Zhu, and X. He. 2019. Cellular composition and differentiation signaling in chicken small intestinal epithelium. *Animals* 9.
- Zhang, M., Q. Li, J. Wang, J. Sun, Y. Xiang, and X. Jin. 2022a. Aflatoxin B1 disrupts the intestinal barrier integrity by reducing junction protein and promoting apoptosis in pigs and mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 247.

- Zhang, Y., J. Meng, L. Zhang, J. Bao, W. Shi, Q. Li, and X. Wang. 2022b. Shudi Erzi San relieves ovary aging in laying hens. *Poult Sci* 101.
- Zhang, C., X. H. Zhao, L. Yang, X. Y. Chen, R. S. Jiang, S. H. Jin, and Z. Y. Geng. 2017. Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers. *Poult Sci* 96:4325–4332.
- Zhao, Z. G., J. H. Li, X. Li, and J. Bao. 2014. Effects of housing systems on behaviour, performance and welfare of fast-growing broilers. *Asian-Australas J Anim Sci* 27:140–146.
- Zhu, L., J. Han, L. Li, Y. Wang, Y. Li, and S. Zhang. 2019. Claudin family participates in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases and colitis-associated colorectal cancer. *Front Immunol* 10.
- Zhu, L., B. Zhang, Y. Dai, H. Li, and W. Xu. 2017. A Review: Epigenetic Mechanism in Ochratoxin A Toxicity Studies. Available at www.mdpi.com/journal/toxins (verified 18 January 2023).
- Zou, Y., Q. Xiang, J. Wang, J. Peng, and H. Wei. 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* 2016.

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

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά στο πλαίσιο της Διδακτορικής Διατριβής

Griela E, Paraskeuas V, Mountzouris KC. Effects of Diet and Phytogetic Inclusion on the Antioxidant Capacity of the Broiler Chicken Gut. *Animals*. 2021; 11(3):739.

Griela E, Paraskeuas V, Bouziotis D, Fegeros K, Antonissen G, Mountzouris KC. Effects of Deoxynivalenol and Fumonisin on Broiler Gut Cytoprotective Capacity. *Toxins*. 2021; 13(10):729.

Griela E, Mountzouris KC. Nutrigenomic profiling of diet type and phytogetic inclusion effects on critical TLR signaling, MAPK-apoptosis and PI3K-Akt-mTOR gene components along the broiler gut. *Poultry Science*. 2023;102:102675

Λοιπές Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά Περιοδικά

Mountzouris, KC, Palamidi, I, Paraskeuas, V, **Griela**, E, Fegeros, K. Dietary probiotic form modulates broiler gut microbiota indices and expression of gut barrier genes including essential components for gut homeostasis. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2019; 103: 1143– 1159.

Mountzouris K.C., Paraskeuas V., **Griela** E., Papadomichelakis G., Fegeros K. Effects of phytogetic inclusion level on broiler carcass yield, meat antioxidant capacity, availability of dietary energy, and expression of intestinal genes relevant for nutrient absorptive and cell growth–protein synthesis metabolic functions. *Animal Production Science* 2020; 60, 242-253.

Mountzouris, K.C., Paraskeuas, V.V., **Griela**, E. Adaptive Poultry Gut Capacity to Resist Oxidative Stress. 2022. In: Kogut, M.H., Zhang, G. Gut Microbiota, Immunity, and Health in Production Animals. *The Microbiomes of Humans, Animals, Plants, and the Environment*, vol 4. Springer, Cham.

Anagnostopoulos EC, Brouklogiannis IP, **Griela** E, Paraskeuas VV, Mountzouris KC. Phytogetic Effects on Layer Production Performance and Cytoprotective Response in the Duodenum. *Animals*. 2023; 13(2):294.

Brouklogiannis IP, Anagnostopoulos EC, **Griela** E, Paraskeuas VV, Mountzouris KC. Dietary phytogetic inclusion level affects production performance and expression of ovarian cytoprotective genes in laying hens. *Poultry Science*. 2023;102(4):102508.

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Ελληνικών Συνεδρίων

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.

Γκρίελα Ε., Παρασκευάς Β., Μπουζιώτης Δ., Φεγγερός Κ. και Μουντζούρης Κ. (2021) Επίδραση δεοξυνιβαλενόλης και φουμονισινών επί της εντερικής κυτταροπροστατευτικής ικανότητας κρεοπαραγωγών ορνιθίων. 35^ο Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (Ε.Ζ.Ε). Νοέμβριος 2021. Αθήνα.

Γκρίελα Ε., Παρασκευάς Β., Μπρουκλόγιαννης Γ., Αναγνωστόπουλος Ε., Μουντζούρης Κ. (2022) Επίδραση του επιπέδου πρωτεΐνης και ενέργειας σε συνδυασμό ή μη με προσθήκη φυτοβιοτικού επί της φλεγμονώδους απόκρισης στο έντερο ορνιθίων. 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΖΕ, Αγρίνιο, Οκτώβριος 2022, *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης*, 51: 69-70.

Μπρουκλόγιαννης Γ., Αναγνωστόπουλος Ε., Παρασκευάς Β., **Γκρίελα** Ε., Μουντζούρης Κ. (2022) Επίδραση του επιπέδου προσθήκης μίγματος φυτοβιοτικών στην παραγωγή και αντιοξειδωτική κατάσταση στις ωοθήκες

ωοτόκων ορνίθων. 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΖΕ, Αγρίνιο, Οκτώβριος 2022, Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, 51: 78-79.

Αναγνωστόπουλος Ε., Μπρουκλόγιαννης Γ., Παρασκευάς Β., **Γκρίελα Ε.**, Μουντζούρης Κ. (2022) Επίδραση του επιπέδου προσθήκης μίγματος φυτοβιοτικών στις αποδόσεις και στην αντιοξειδωτική κατάσταση του δωδεκαδάκτυλου ωοτόκων ορνίθων. 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΖΕ, Αγρίνιο, Οκτώβριος 2022, Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, 51: 86.

Παλαμίδα Ι., Παρασκευάς Β., Μπρουκλόγιαννης Γ., Αναγνωστόπουλος Ε., **Γκρίελα Ε.**, Πολίτης Ι., Φεγγερός Κ., Μουντζούρης Κ. (2022) Επίδραση της ενσωμάτωσης όξινου ορού γιαούρτης στη σύνθεση και τη μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας στα τυφλά έντερα ορνιθίων κρεοπαραγωγής. 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΖΕ, Αγρίνιο, Οκτώβριος 2022, Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, 51: 89-90.

Παρασκευάς Β., Μπρουκλόγιαννης Γ., Αναγνωστόπουλος Ε., **Γκρίελα Ε.**, Μουντζούρης Κ. (2022) Επίδραση του επιπέδου προσθήκης μίγματος φυτοβιοτικών στην παραγωγή και στην ποιότητα του αυγού ωοτόκων ορνίθων. 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΖΕ, Αγρίνιο, Οκτώβριος 2022, Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, 51: 91-92.

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Διεθνών Συνεδρίων

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

Mountzouris K. C., Paraskeuas V., **Griela E.**, Kern A. and Fegeros K. (2018) Phytogetic Inclusion Level Effects on Broiler Growth, Nutrient Digestibility, Total Antioxidant Capacity and Antioxidant Enzymes Gene Expressions. Department of Nutritional Physiology and Feeding, Agricultural University of Athens, Greece and 2 Anco Animal Nutrition Competence GmbH, Austria. 11th Asian Pacific Poultry Conference. Thailand. March 25-27. 2018.

Mountzouris K., Paraskeuas V., **Griela E.**, Kern A., Fegeros K. (2018). 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. Georgia World Congress Center, Atlanta. January 29-30, 2018.

Antonissen G., Immerseel F. V., Paraskeuas V., **Griela E.**, Goossens E., Verlinden M., Ducatelle R., Haesebrouck F., Reisinger N., Croubels S., Mountzouris K. C.. (2019). A phytogenic feed additive suppresses inflammatory signals in the gut by controlling the activation of the MAPK pathway and decreasing the level of Enterobacteriaceae in broiler chickens. ESPN 2019, Poland

Antonissen G., Goossens E., Paraskeuas V., **Griela E.**, Verlinden M., Croubels S., Ducatelle R., Haesebrouck F., Reisinger N., Immerseel F. V., Mountzouris K. C. (2019). Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota in Broiler Chickens. 6th International Conference on Poultry Intestinal Health, 2019

Griela E., Paraskeuas V., Bouziotis D., Fegeros K., Antonissen G., and Mountzouris K. (2021). Effects of Fusarium mycotoxins on broiler gut cytoprotective capacity. 31/10–3/11/2021 Symposium on Gut Health in Production of Food Animals, St. Louis, Missouri

Brouklogiannis I., Anagnostopoulos E., Paraskeuas V., **Griela E.**, Kern A., Mountzouris C.K. (2022) Dietary phytogenic inclusion level effects on egg production, egg quality and expression of ovarian cytoprotective genes in laying hens. PSA Annual Meeting, San Antonio, Texas, July 11-14, 2022 pp 74.

Anagnostopoulos E., Brouklogiannis I., Paraskeuas V., **Griela E.**, Kern A., Mountzouris C.K. (2022) Production performance and gut cytoprotective response in laying hens fed with different phytogenic levels. PSA Annual Meeting, San Antonio, Texas, July 11-14, 2022 pp 74.

Συμμετοχή σε ερευνητικά Προγράμματα

1. «Χαρακτηρισμός σημαντικών βιοδεικτών που σχετίζονται με την εντερική λειτουργία και υγεία κρεοπαραγωγών ορνιθίων», με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **01/09/2017** έως **31/12/2017**.
2. «Χαρτογράφηση και επιβεβαίωση των ισοδύναμων σε ενέργεια και πρωτεΐνη μιγμάτων φυτικών εκχυλισμάτων και προβιοτικών για την επίτευξη των βέλτιστων αποδόσεων», με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **15/03/2018** έως **15/06/2018**.
3. «Advancing knowledge regarding the energy and protein sparing potential of phytogenics and probiotics at gut and overall broiler level» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **10/03/2020** έως **10/07/2020**.
4. «Evaluation of feed- flavouring compounds formulation for their effects on broiler performance, gut and liver function biomarkers» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **10/03/2020** έως **10/07/2020**.
5. «Evaluation of vitamin D3 levels and its metabolites on performance, egg quality and physiological biomarkers in older laying hens» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **10/03/2020** έως **10/07/2020**.
- 6.«Χαρτογράφηση του προφίλ μοριακών βιοδεικτών της εντερικής αντιοξειδωτικής κατάστασης και ακεραιότητας σε πειραματικό πρότυπο ανάπτυξης εντερικής δυσβίωσης σε ορνίθια μέσω της διατροφής και παρουσίας μυκοτοξινών.» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **31/03/2020** έως **και 31/10/2021**. (Υποτροφία)
7. «Evaluation of phytogenic premix inclusion level on hen laying performance, egg quality and critical gut, liver and ovaries function biomarkers» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **01/01/2020** έως **και 31/03/2021**.
8. «Analysis of critical biomarkers in broiler chickens » με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **19/02/2021** έως **και 31/07/2021**.

9. «Μελέτη της επίδρασης του επιπέδου προσθήκης μιας σύνθεσης φυτικών βιοενεργών συστατικών στη διατροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **19/04/2021** έως και **28/02/2022** και με σύμβαση ανάθεσης έργου από **01/03/2022** έως και **09/05/2022**.
10. «Multi-efficacy assessment of a dietary plant bioactive formulation in pigs and poultry / Πολλαπλή αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μιας σύνθεσης φυτικών βιοενεργών συστατικών στη διατροφή χοίρων και πτηνών» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με σύμβαση ανάθεσης έργου από **01/03/2022** έως και **30/11/2022**.
11. «Οξινος ορός γιαούρτης: Μετατρέποντας ένα περιβαλλοντικό πρόβλημα σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας» με Επιστ. Υπεύθυνους τον κ. Πολίτη Ιωάννη, Καθηγητή και τον κ. Θεοδώρου Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή με ιδιωτικό συμφωνητικό από **10/07/2021** έως και **28/02/2022** και με σύμβαση ανάθεσης έργου από **01/03/2022** έως και **31/01/2023**.
12. «Efficacy optimization of dietary plant bioactive formulation in poultry nutrition» με Επιστ. Υπεύθυνο τον κ. Κ. Μουντζούρη, Καθηγητή, με ιδιωτικό συμφωνητικό, από **12/04/2023** έως και **σήμερα**.