

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

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΕ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**  
**ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**  
**ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ**

***ΤΣΙΡΤΣΙΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ***

**Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Φεγγερός Κ. Καθηγητής**

**Ζέρβας Γ. Καθηγητής**

**Μουντζούρης Κ. Επ. Καθηγητής**

**Αθήνα, Μάρτιος 2015**

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

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΕ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**  
**ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**  
**ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ**

***ΤΣΙΡΤΣΙΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ***

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Φεγγερός Κ. Καθηγητής**

**Ζέρβας Γ. Καθηγητής**

**Μουντζούρης Κ. Επ. Καθηγητής**

**Πολίτης Ι. Καθηγητής**

**Κομινάκης Α. Αν. Καθηγητής**

**Ντότας Δ. Καθηγητής**

**Φλώρου-Πανέρη Π. Καθηγήτρια**

**Αθήνα, Μάρτιος 2015**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θεωρώ μεγάλη μου υποχρέωση και επιθυμώ ειλικρινά να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν, με τον τρόπο τους, στην πραγματοποίηση και την ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής κ. Κωνσταντίνο Μουντζούρη γιατί με δίδαξε τον τρόπο να εργάζομαι ανεξάρτητα, δημιουργώντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για να αναπτύξω τις ιδέες μου χωρίς περιορισμούς. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Ζέρβα, Καθηγητή-Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής και τον κ. Κωνσταντίνο Φεγγερό, Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής για την ουσιαστική επιστημονική καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία τους από την ανάθεση ως και την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Χρήστο Μπαλάσκα, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων για την καθοδήγησή του και τις υποδείξεις του στις ιστολογικές αναλύσεις και τον κ. Αντώνιο Κομινάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενετικής βελτίωσης για τις πολύτιμες ώρες που μου προσέφερε για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της εργασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την κα Φλώρου-Πανέρη Π., Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Διατροφής του Α.Π.Θ., τον κ. Ντότα Δ., Καθηγητή του Εργαστηρίου Διατροφής του Α.Π.Θ. και τον κ. Πολίτη Ι., Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γ.Π.Α. για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις τους κατά τη διόρθωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Επιθυμώ να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους κ. Γεώργιο Παπαδομιχελάκη, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων, κ. Ευάγγελο Ζωΐδη, Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων και κ. Αθανάσιο Παππά, Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων, για την αμέριστη βοήθειά τους και την ηθική συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της έρευνάς μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλέξανδρο Αράπη, Μέλος Ε.Ε.Δ.Ι.Π. του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια των αναλύσεων Weende.

Ευχαριστώ τους Υποψήφιους Διδάκτορες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Ζώων Ίριδα Παλαμίδα και Βασίλη Παρασκευά, καθώς και τους Δημήτριο Μανίκα, Θεοφάνη Λίπα, και Κατερίνα Αρβανίτη για την βοήθειά τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και των εργαστηριακών αναλύσεων.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Κληροδότημα Τριανταφυλλίδη για την οικονομική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Μιχάλη,  
Ξέρω πόσο πολύ το ήθελες...

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
B. ABSTRACT	11
Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	
1. Εισαγωγή	14
1.1 Πρόσθετες ύλες στη διατροφή των ζώων	15
1.1.1 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί	16
1.1.2 Βιοενεργές προβιοτικές ουσίες (prebiotics)	17
1.1.3 Αιθέρια Έλαια	18
1.1.4 Οξινιστές/ οργανικά οξέα	19
1.1.5 Ένζυμα	20
1.2 Ανάπτυξη του γαστρεντερικού συστήματος των πτηνών	21
1.3 Γλυκοκάλυκας	23
1.4 Βλεννοπρωτεΐνες	24
1.4.1 Δομή βλεννοπρωτεϊνών	25
1.4.2 Γονιδιακή έκφραση βλεννοπρωτεϊνών	29
1.4.3 Βιοσύνθεση βλεννοπρωτεϊνών	31
1.4.4 Αποθήκευση και έκκριση βλεννοπρωτεϊνών	32
1.5 Σχέση βλεννοπρωτεϊνών και μικροοργανισμών	33
1.5.1 Βακτηριακή προσκόλληση στις βλεννοπρωτεΐνες	33
1.5.2 Βακτηριακή αποδόμηση των βλεννοπρωτεϊνών του γλυκοκάλυκα	35
1.6 Επίδραση της διατροφής στη φυσιολογία των βλεννοπρωτεϊνών	37
1.7 Ανακεφαλαίωση	42
Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	44

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.1 Χώρος Διεξαγωγής των Πειραμάτων	45
2.2 Πειραματικό Ζωικό Υλικό και Συνθήκες Εκτροφής	45
2.3 Σιτηρέσια	45
2.4 Πρόσθετες ύλες διατροφής	47
2.5 Πειραματικές επεμβάσεις	47
2.6 Προσδιορισμός παραγωγικών χαρακτηριστικών	48
2.7 Προσδιορισμός ειλεακής και ολικής πεπτικότητας	48
2.8 Προσδιορισμός της βιοχημικής σύστασης των βλενοπρωτεϊνών του εντέρου	50
2.8.1 Απομόνωση βλέννης από το εντερικό επιθήλιο	51
2.8.2 Απομόνωση των βλενοπρωτεϊνών από τη βλέννη	52
2.8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνης, γαλακτόζης, μαννόζης και φουκόζης	52
2.8.3.1 Υδρόλυση εντερικών βλενοπρωτεϊνών και πρότυπων αναφοράς	54
2.8.3.2 Παραγωγοποίηση των μονοσακχαριτών με 2-αμινο-βενζοϊκό οξύ	54
2.8.3.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη, N-ακετυλ-γλουκοζαμίνη, Γαλακτόζη, Μαννόζη και Φουκόζη	55
2.8.4 Ποσοτικός προσδιορισμός N-ακετυλ-νευραμινικού (σιαλικού) οξέος	56
2.8.4.1 Ήπια υδρόλυση εντερικών βλενοπρωτεϊνών και πρότυπων αναφοράς	56
2.8.4.2 Παραγωγοποίηση του ΝακΝευ με ορθο-φαινυλ-διαμίνη	56
2.8.4.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για ΝακΝευ	57
2.9 Ιστολογία εντέρου	58
2.9.1 Επικάλυψη αντικειμενοφόρων πλακών με πολυμερισμένη L-λυσίνη	58
2.9.2 Χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης	59

2.9.2.1 Μέτρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών του εντερικού επιθηλίου	59
2.9.3 Χρώση Alcian Blue-PAS pH 2.5	60
2.9.3.1 Μέτρηση του πάχους του γλυκοκάλυκα	60
2.9.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός της έντασης χρώσης του γλυκοκάλυκα	60
2.10 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	62
3. Πειραματική Μελέτη Α	
3.1 Σύντομη περιγραφή άρθρου: Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins and cecal microflora composition.	64
3.2 Σύντομη περιγραφή άρθρου: Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers	68
3.3 Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα πειράματος Α	73
3.4 Σχολιασμός αποτελεσμάτων πειράματος Α	75
4. Πειραματική Μελέτη Β	
4.1 Σύντομη περιγραφή άρθρου: Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition	88
4.2 Σύντομη περιγραφή άρθρου: Modulation of intestinal composition and mucosal morphology by dietary phytogetic inclusion level in broilers	92
4.3 Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα πειράματος Β	97
4.4 Σχολιασμός αποτελεσμάτων πειράματος Β	98
Ε. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	104
ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	109
Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Χρωματογραφήματα για τον προσδιορισμό των Ν-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, Ν-ακετυλ-γαλακτοζαμίνης, γαλακτόζης, μαννόζης και φουκόζης	137
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Χρωματογραφήματα για τον προσδιορισμό του σιαλικού οξέος	139



- ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. Ανάτυπο άρθρου: Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Mountzouris K. C., Tsirtsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G., Fegeros K., (2010). *Poultry Science*, 89 140
- ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4. Ανάτυπο άρθρου: Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphometry in broilers. Tsirtsikos P., Fegeros K., Balaskas C., Kominakis A., Mountzouris K. C. (2012a). *Poultry Science*, 91 141
- ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5. Ανάτυπο άρθρου: Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. Mountzouris K. C., Paraskevas V., Tsirtsikos P., Palamidi I., Steiner T., Schatzmayr G., Fegeros K., (2011). *Animal Feed Science and Technology*, 168 142
- ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6. Ανάτυπο άρθρου: Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary inclusion level in broilers. Tsirtsikos P., Fegeros K., Kominakis A., Balaskas C., Mountzouris K. C. (2012b). *Animal*, 6 143

## ΠΙΝΑΚΕΣ/ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

<b>Πίνακας 1.4.1.α.</b> Σύσταση (ως % των συνολικών υδατανθράκων) των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών	27
<b>Πίνακας 1.4.2.α.</b> Γονιδιακή έκφραση βλεννοπρωτεϊνών ανάλογα με το μέρος του γαστρεντερικού τμήματος που απαντώνται	30
<b>Πίνακας 1.5.1.α.</b> Πιθανοί υποδοχείς για βακτηριακή προσκόλληση	34
<b>Πίνακας 1.5.2.α.</b> Παραδείγματα βακτηριακής αποδόμησης των βλεννοπρωτεϊνών με αναφορά στο είδος των βακτηρίων, τα ένζυμα που παράγουν και το λειτουργικό τους ρόλο τους στην αποδόμηση	36
<b>Πίνακας 1.6.α.</b> Επίδραση της διατροφής σε φυσιολογικές παραμέτρους των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής	38
<b>Πίνακας 2.1</b> Σύσταση βασικών σιτηρεσίων ανά παραγωγική φάση	46
<b>Πίνακας 2.2</b> Πίνακας έκλουσης διαλυμάτων κινητής φάσης HPLC για ΝακΓλκ, ΝακΓαλ, Γαλ, Μαν και Φουκ	55
<b>Πίνακας 2.3</b> Πίνακας έκλουσης διαλυμάτων κινητής φάσης HPLC για ΝακΝευ	57
<b>Πίνακας 3.3.1.</b> Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την εναρκτήρια φάση, 0-14 ημέρες	79
<b>Πίνακας 3.3.2.</b> Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την φάση ανάπτυξης 15-28 ημέρες	80
<b>Πίνακας 3.3.3.</b> Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την φάση πάχυνσης, 29-42 ημέρες	81
<b>Πίνακας 3.3.4.</b> Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος, 0-42 ημέρες	82
<b>Πίνακας 3.3.5.</b> Ειλεακή φαινομένη πεπτικότητα ορνιθίων κρεοπαραγωγής 28 ημερών	83
<b>Πίνακας 3.3.6.</b> Ολική φαινομένη πεπτικότητα και φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια ορνιθίων κρεοπαραγωγής 28 ημερών	84

<b>Πίνακας 3.3.7.</b> Ολική συγκέντρωση (μg/ml διαλύματος βλεννινών) των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών	85
<b>Πίνακας 3.3.8</b> Επίδραση της ηλικίας και του τμήματος του εντέρου στην συγκέντρωση και την μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών στο λεπτό έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής	86
<b>Πίνακας 3.3.9.</b> Μελέτη της επίδρασης της επέμβασης, της ηλικίας, του εντερικού τμήματος και του τμήματος της λάχνης/κρύπτης στη χρώση του στρώματος της βλέννης	87
<b>Πίνακας 4.3.1.</b> Θνησιμότητα και Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας (EPEF) κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος (1-42 ημέρες)	101
<b>Πίνακας 4.3.2.</b> Ολική συγκέντρωση (μg/ml διαλύματος βλεννινών) των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών	102
<b>Πίνακας 4.3.3.</b> Επίδραση της ηλικίας και του τμήματος του εντέρου στην συγκέντρωση και την μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών στο λεπτό έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής	103

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

ΑΑΠ: ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΑΒΟ: 2-ΑΜΙΝΟ-ΒΕΝΖΟΪΚΟ ΟΞΥ

ΑΜΕ<sub>n</sub>: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΤΕΑ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΡΟΦΗΣ ΔΙΟΡΘΩΜΕΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗ Ν

ΑΟ: ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

ΑΣΒ: ΑΥΞΗΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

ΒΚ: ΒΑΘΟΣ ΚΡΥΠΤΗΣ

ΓΑΛ: ΓΑΛΑΚΤΟΖΗ

ΓΕΣ: ΓΑΣΤΡΟ-ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ΕΑΑ: ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

ΕΝΕΟ: ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΑΖΩΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

ΙΟ: ΙΝΩΔΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ

ΚΤ: ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΗΣ

ΛΟ: ΛΙΠΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

ΜΑΝ: ΜΑΝΝΟΖΗ

ΜΕΤ: ΜΕΤΑΤΡΕΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΡΟΦΗΣ

ΝΑΚΓΑΛ: Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΓΑΛΑΚΤΟΖΑΜΙΝΗ

ΝΑΚΝΕΥ: Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

ΝΑΚΓΑΚ: Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ

ΞΟ: ΞΗΡΑ ΟΥΣΙΑ

ΟΟ: ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

ΟΦΔ: ΟΡΘΟ-ΦΑΙΝΥΛ-ΔΙΑΜΙΝΗ

ΠΛΟ: ΠΗΚΤΙΚΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

ΣΒ: ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ

ΣΕΤ: ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΟΦΗΣ

ΥΛ: ΥΨΟΣ ΛΑΧΝΗΣ

ΦΟΥΚ: ΦΟΥΚΟΖΗ

ΦΠαο: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

ΦΠενεο: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΕΟ

ΦΠλο: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

ΦΠξο: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΞΗΡΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

ΦΠοο: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

ΦΠτε: ΦΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΕΦΡΑΣ

CFU: COLONY FORMING UNITS

PBS: ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

# Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΕ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΣΙΡΤΣΙΚΟΣ

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55, email:*

[kmountzouris@aua.gr](mailto:kmountzouris@aua.gr)

## A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τριών διαφορετικών επιπέδων προσθήκης ενός πολυστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος (ΠΣ) και ενός μίγματος αιθερίων ελαίων (ΜΑΕ) στα παραγωγικά χαρακτηριστικά, στους συντελεστές φαινομένης πεπτικότητας, στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών που απαρτίζουν τις πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες (carbohydrate side chains) των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών, τη μορφολογία του εντερικού βλεννογόνου, την ένταση χρώσης και το πάχος του γλυκοκάλυκα που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής Cobb 500. Για το σκοπό του πειράματος εφαρμόστηκε πρόγραμμα διατροφής τριών φάσεων (εναρκτήριο 1-14ημ, ανάπτυξης 15-28ημ και τελικής πάχυνσης 29-42ημ.). Συγκεκριμένα, καταρτίστηκαν τρία σιτηρέσια με βάση τον αραβόσιτο και το σογιάλευρο (ΒΣ) προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες των ορνιθίων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά σε καθεμία από τις παραπάνω φάσεις ανάπτυξης. Αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής μίας ημέρας τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 πειραματικές επεμβάσεις, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά ως εξής: για το πείραμα Α, ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη πρόσθετων διατροφής (μάρτυρας, C), ΒΣ με προσθήκη  $10^8$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P1), ΒΣ με προσθήκη  $10^9$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P2), ΒΣ με προσθήκη  $10^{10}$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση Α). Για το πείραμα Β, ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη πρόσθετων διατροφής (μάρτυρας, C), ΒΣ με προσθήκη 80 mg ΜΑΕ / kg τροφής (επέμβαση E1), ΒΣ με προσθήκη 125 mg ΜΑΕ / kg τροφής (επέμβαση E2), ΒΣ με προσθήκη 250 mg ΜΑΕ / kg τροφής (επέμβαση E3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση Α).

Για το πείραμα Α, η αύξηση του ΣΒ για τη συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν σημαντικά υψηλότερη στην επέμβαση P1 σε σύγκριση με τις επεμβάσεις P2, C και P3, με την επέμβαση Α να μην διαφέρει μόνο από την επέμβαση P1. Ο ΣΕΤ για τη συνολική διάρκεια του πειράματος στις επεμβάσεις P1 και Α ήταν βελτιωμένος σε σύγκριση με τις τιμές του ΣΕΤ στις υπόλοιπες επεμβάσεις. Η ειλεακή πεπτικότητα των αζωτούχων και των λιπαρών ουσιών ήταν υψηλότερη στην επέμβαση του αντιβιοτικού. Παρατηρήθηκε γραμμική μείωση της μαννόζης με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο δωδεκαδάκτυλο και τον ειλεό ορνιθίων 14 ημερών. Στο τυφλό έντερο των ορνιθίων 42 ημερών, η συγκέντρωση της Ν-ακετυλ-γλουκαζαμίνης και της γαλακτόζης μειώθηκε γραμμικά ενώ η συγκέντρωση της φουκόζης αυξήθηκε γραμμικά με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο. Το ύψος των λαχνών και το βάθος των κρυπτών στο τυφλό έντερο αυξήθηκαν γραμμικά με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού, με την επέμβαση Α να έχει υψηλότερες τιμές μόνο από το μάρτυρα. Η αύξηση του επιπέδου προσθήκης είχε ως αποτέλεσμα τη

γραμμική αύξηση του πάχους του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 και 42 ημερών.

Για το πείραμα Β, παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση του ΣΒ και εκθετική επίδραση της κατανάλωσης της τροφής για τη συνολική διάρκεια του πειράματος με την αύξηση της συγκέντρωσης του ΜΑΕ στο σιτηρέσιο. Το επίπεδο προσθήκης ΜΑΕ είχε εκθετική επίδραση στο συντελεστή ολικής πεπτικότητας της οργανικής ουσίας και της φαινομένης μεταβολιστέας ενέργειας των πτηνών. Από την άλλη πλευρά, τα ορνίθια, που το σιτηρέσιό τους περιείχε αβιλαμυκίνη, είχαν υψηλότερη ειλεακή και ολική πεπτικότητα λιπαρών ουσιών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ορνίθια. Στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 ημερών, οι επεμβάσεις Ε2 και Ε3 είχαν υψηλότερες τιμές μαννόζης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επιπροσθέτως, οι βλεννοπρωτεΐνες του ειλεού των ορνιθίων στις επεμβάσεις με το ΜΑΕ είχαν υψηλότερο ποσοστό μαννόζης σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ το ποσοστό της γαλακτόζης ήταν υψηλότερο στις επεμβάσεις Ε2 και Ε3 σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C και Α. Στα ορνίθια 14 ημερών, η αύξηση του επιπέδου προσθήκης ΜΑΕ στο σιτηρέσιο είχε ως αποτέλεσμα την επίδραση στη συγκέντρωση της μαννόζης και της Ν-ακετυλ-γαλακτοζαμίνης στο δωδεκαδάκτυλο, στη συγκέντρωση της μαννόζης, της γαλακτόζης και της φουκόζης στον ειλέο και στη συγκέντρωση της Ν-ακετυλ-γαλακτοζαμίνης στο τυφλό έντερο των πτηνών. Τέλος, με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης ΜΑΕ παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση του λόγου ύψος λαχνών/βάθος κρυπτών στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 ημερών και του ύψους των λαχνών στον ειλέο ορνιθίων 42 ημερών.

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την αποτελεσματική αντικατάσταση αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων με πρόσθετα διατροφής που βασίζονται σε ζωντανούς μικροοργανισμούς ή σε ενεργές ουσίες φυτικών εκχυλισμάτων. Τα υποεξέταση πρόσθετα διατροφής επηρέασαν θετικά τα παραγωγικά χαρακτηριστικά (π.χ. αύξηση σωματικού βάρους, συντελεστή εκμετάλευσης τροφής), την πεπτικότητα, τη σύσταση των εντερικών γλυκοπρωτεϊνών και άλλα χαρακτηριστικά του γλυκοκάλυκα, καταδεικνύοντας αφενός το βιοενεργό ρόλο των πρόσθετων υλών που χρησιμοποιήθηκαν και αφετέρου τις περιοχές του εντερικού σωλήνα που σημειώθηκαν αλλαγές σε παραμέτρους της εντερικής οικολογίας. Οι αλλαγές αυτές χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για την αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου των προσθέτων στην ανάπτυξη και την υγεία των πτηνών.

**Λέξεις κλειδιά:** ορνίθια κρεοπαραγωγής, προβιοτικό, αιθέρια έλαια, παραγωγικά χαρακτηριστικά, πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών, γλυκοκάλυκας, σύσταση βλεννοπρωτεϊνών, μορφολογία εντέρου.

# NUTRITIONAL EFFECTS ON PARAMETERS OF THE BROILER GASTROINTESTINAL ECOLOGY

PANAGIOTIS TSIRTSIKOS

*Faculty of Animal Science & Aquaculture, Department of Nutritional Physiology and Feeding, Iera odos 75, Athens, 118 55 email: [kmountzouris@aua.gr](mailto:kmountzouris@aua.gr)*

## B. ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of three inclusion levels of a probiotic (experiment A) and a phytogenic (experiment B) feed additive (PFA) on broiler growth performance, nutrient digestibility, mucin composition (monosaccharide ratio), mucosal morphometry, mucus layer staining intensity and mucus layer thickness along the broiler intestinal tract. One-day-old Cobb broilers were administered maize-soyabean meal basal diet and, depending the feed additive used, broilers were allocated into the following 5 experimental treatments. For experiment A, control C (BD, no additive), treatment P1 ( $10^8$  CFU of probiotic/kg of BD), treatment P2 ( $10^9$  CFU of probiotic/kg of BD), treatment P3 ( $10^{10}$  CFU of probiotic/kg of BD), and treatment A (2,5 mg avilamycin/kg of BD). For experiment B, control C (BD based on maize-soybean meal with no other additions), E1 (80 mg PFA/kg BD), E2 (125 mg PFA/kg BD), E3 (250mg PFA/kg of BD) and A (2,5 mg avilamycin/kg BD). Treatment A was used as a positive control due to the well-known function of avilamycin as an antimicrobial growth promoter in poultry.

For experiment A, overall BW gain was significantly higher in treatment P1 compared with P2, C and P3, with A being intermediate and not different from P1. Overall feed conversion ratio (FCR) values were similar and significantly better for P1 and A compared with P2, C, and P3. Ileal apparent digestibility coefficients of CP and ether extract were higher in A. Mannose decreased linearly with increasing probiotic level in duodenum and ileum of 14-d-old broilers. *N*-acetyl-glucosamine and galactose decreased linearly, while fucose increased linearly with increasing probiotic feed inclusion level in 42-d-old broiler cecum. Cecal villus height and crypt depth increased linearly with probiotic inclusion level, with treatment A having higher values only from treatment C. Mucus layer thickness increased linearly with probiotic inclusion level in duodenum at 14 d and 42 d.

For experiment B, overall BWG increased linearly with increasing PFA level, however, the avilamycin treatment A did not differ from the PFA and C treatments. Overall FI decreased quadratically with increasing PFA level. The overall FCR improved linearly with increasing PFA level and treatment A did not differ from E2 and E3 but it was significantly better compared to E1 and C. The PFA level had a significant quadratic effect on the total tract apparent digestibility of OM and the nitrogen corrected apparent metabolisable energy (AMEn) of experimental diets respectively. On the other hand, the avilamycin treatment had a significantly higher coefficients of ileal and total



apparent digestibility of fat compared to the PFA treatments and C. In 14-day-old broilers, treatments E2 and E3 had higher duodenal mannose than treatments C, E1 and A. Ileal mannose was lower in treatment C compared with PFA treatments, and ileal Gal was higher in treatments E2 and E3 compared with C and A. Polynomial contrast analysis with respect to PFA inclusion level showed that in 14-day-old broilers there was a linear increase in duodenal mannose and a quadratic effect in duodenal N-acetylgalactosamine with increasing PFA level. Ileal Gal and Man increased linearly with PFA inclusion level. However, increasing PFA inclusion level resulted in a linear decrease of ileal fucose and cecal N-acetylgalactosamine. Increasing dietary PFA inclusion level showed a pattern of linear increase of duodenal Vh/Cd ratio in 14-day-old broilers and ileal Vh in 42-day-old broilers.

In conclusion, this study provides evidence that probiotic and phytogetic feed additive inclusion level affects the performance and a number of parameters of intestinal ecology in broilers.

**Key words: broiler, probiotic, essential oils, performance, nutrient digestibility, mucus, mucin composition, intestinal morphology.**

## **Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

## 1. Εισαγωγή

Η σύγχρονη πτηνοτροφία και τα προϊόντα που προέρχονται από πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις έχουν αυξηθεί περισσότερο από οποιαδήποτε βιομηχανία που αφορά τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Windhorst, 2006). Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση της AVEC (Assosiation of Poultry Processors and poultry Trade in the EU Countries, 2013), για την περίοδο 2013-2022 το κρέας των πουλερικών αναμένεται να παραμείνει ως ο τομέας της κρεοπαραγωγικής κτηνοτροφίας με την υψηλότερη ανάπτυξη (+2,2% κάθε χρόνο) παγκοσμίως και αναμένεται να έχει τον υψηλότερο όγκο παραγωγής στο τέλος της περιόδου, ξεπερνώντας το χοιρινό κρέας. Για την ίδια χρονική περίοδο, η παγκόσμια κατανάλωση κρέατος θα συνεχίσει να αυξάνεται αλλά με μικρότερο ρυθμό σε σύγκριση με την προηγούμενη δεκαετία (μέσος όρος +1,6% ανά χρόνο σε σύγκριση με +2,3% για τη δεκαετία 2003-2012). Παρά τη μείωση στο ρυθμό αύξησης, η κατανάλωση κρέατος πουλερικών θα αυξηθεί σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες κρέατος, ως την πιο προσιτή και ευρέως αποδεκτή πηγή ζωικής πρωτεΐνης για την ανθρώπινη διατροφή και θα αντιπροσωπεύει το 46% της επιπρόσθετης κατανάλωσης κρέατος ως το 2022. Όσον αφορά την κατανάλωση κρέατος πουλερικών στην Ε.Ε., αναμένεται αύξηση της τάξεως του 4,3% και θα φτάσει στα επίπεδα των 24,1 κιλών κατά κεφαλήν (23,1 κιλά κατά κεφαλήν το 2013) μέχρι το 2022. Παράλληλα, οι βελτιωμένες αποδόσεις των υβριδίων των εταιριών γενετικού υλικού έχουν οδηγήσει σε μείωση του χρόνου που τα πτηνά φτάνουν στο τελικό βάρος σφαγής.

Η αύξηση του παραγωγικού δυναμικού της σύγχρονης πτηνοτροφίας απαιτεί βέλτιστη πέψη, χρησιμοποίηση και μετατρεψιμότητα των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου. Απαραίτητη προϋπόθεση, η βέλτιστη εντερική υγεία των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Η εντερική υγεία έχει σημαντική επίδραση στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και την ευζωΐα των ορνιθίων καθώς είναι υπεύθυνη για την πεπτικότητα της τροφής, την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, τη χρησιμοποίηση της ενέργειας και των πρωτεϊνών του σιτηρεσίου, την ανοσία και την ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών, το μεταβολισμό και τη φυσιολογία των πτηνών. Πράγματι, η εντερική υγεία πρέπει να είναι η μεγαλύτερη ανησυχία για τους παραγωγούς καθώς επηρεάζει την παραγωγικότητα των πτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων, την οικονομική αιφορία και την ανησυχία του καταναλωτή για την ασφάλεια και την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων. Η εντερική υγεία και η διατροφή είναι αλληλοεξαρτούμενοι παράγοντες,

καθώς η βέλτιστη εκμετάλλευση των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου δε θα μπορεί να πραγματοποιηθεί αν το γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ) δεν βρίσκεται σε υγιή και λειτουργική κατάσταση.

Παραδοσιακά, η εντερική υγεία βρισκόταν σε άμεση εξάρτηση με την προφυλακτική και θεραπευτική χρησιμοποίηση διάφορων αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως τα αντιβιοτικά. Όμως, λόγω της αλόγιστης και υπερβολικής χρησιμοποίησής τους, πολλοί μικροοργανισμοί ανέπτυξαν ανθεκτικά στελέχη. Σύμφωνα με το European Centre for Disease Prevention and Control, εκτιμάται ότι κάθε χρόνο, 25.000 άνθρωποι πεθαίνουν και ζημιές ύψους >1,5 δις ευρώ σε ιατροφαρμακευτική περίθαλψη και παραγωγικές απώλειες οφείλονται στην ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροβιακών στελεχών ([http://ec.europa.eu/health/antimicrobial\\_resistance/policy/](http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/policy/)). Για τη μείωση του φαινομένου, η Ε.Ε. πραγματοποίησε μια σειρά από σημαντικά μέτρα στον τομέα της ιατρικής και κτηνιατρικής φαρμακολογίας και της κτηνοτροφίας (COM748, 2001). Η απαγόρευση της χρήσης των αντιβιοτικών ως πρόσθετα διατροφής το 2006, έφερε εναλλακτικές διατροφικές στρατηγικές για την εξασφάλιση της εντερικής υγείας των πτηνών και τον έλεγχο της μόλυνσης από εντερικά παθογόνα.

## 1.1 Πρόσθετες ύλες στη διατροφή ζώων

Διάφορες στρατηγικές έχουν προταθεί ως μέσα ελέγχου της εντερικής μικροχλωρίδας και της εντερικής υγείας μέσω της διατροφής. Οι αντιβιοτικοί αυξητικοί παράγοντες (ΑΑΠ) είχαν ως τρόπο δράσης τη μείωση του μικροβιακού φορτίου στο ΓΕΣ, με σκοπό περισσότερα θρεπτικά συστατικά να χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη και την παραγωγή. Αντιθέτως, τα περισσότερα ‘εναλλακτικά’ πρόσθετα διατροφής διαφοροποιούν τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας, ευνοώντας την αποίκιση ωφέλιμων βακτηρίων εις βάρος παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτά τα πρόσθετα διατροφής συμβάλουν στην προστασία της εντερικής υγείας με διάφορους πιθανούς μηχανισμούς δράσης: διαφοροποιώντας το pH του εντέρου, με την παραγωγή προστατευτικών εντερικών γλυκοπρωτεϊνών, ενθαρρύνοντας τη ζύμωση με αποτέλεσμα την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων, αυξάνοντας την ανοσολογική (ανοσιακή) απάντηση και αυξάνοντας την κατανάλωση θρεπτικών συστατικών (Ferket, 2003). Τα

κυριότερα εναλλακτικά πρόσθετα αναφέρονται στον κανονισμό 1831/2003 της ΕΕ, που αφορά τις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων, και ανήκουν στις λειτουργικές ομάδες:

- Σταθεροποιητές της γλωρίδας των εντέρων (προβιοτικά, βιοενεργές προβιοτικές ουσίες- prebiotics)
- Αρωματικές σύνθετες ουσίες (αιθέρια έλαια)
- Βελτιωτικά της πεπτικότητας (ένζυμα)
- Άλλες ζωοτεχνικές πρόσθετες ύλες (οξινιστές)

### 1.1.1 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός προσδιορίζεται ως ένα ζωντανό πρόσθετο διατροφής που επηρεάζει ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή ισορροπία (Fuller, 1989). Τα γένη των μικροοργανισμών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* χρησιμοποιούνται συστηματικά στους ανθρώπους, ενώ τα είδη των βακτηρίων *Bacillus*, *Enterococcus* και του μύκητα *Saccharomyces* είναι ευρέως διαδεδομένα στην κτηνοτροφία (Salminen et al., 1998). Ένα πλήθος μελετών έχει αποδείξει την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών έναντι σε ΑΑΠ. Πιο συγκεκριμένα, προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν ευεργετική επίδραση α) στα παραγωγικά χαρακτηριστικά (Kabir et al., 2004; Kralik et al., 2004; Gil De Los Santos et al., 2005; Sun et al., 2005; Mountzouris et al., 2007; Vicente et al., 2007; Apata, 2008), β) στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Apata, 2008; Li et al., 2008, Mountzouris et al., 2010) γ) στη διαμόρφωση της εντερικής μικρογλωρίδας (Koenen et al., 2004; Mountzouris et al., 2007; Teo and Tan, 2007; Yu et al., 2008), δ) στην παρεμπόδιση παθογόνων μικροοργανισμών (Dalloul et al., 2005; Higgins et al., 2008; Vicente et al., 2008; Mountzouris et al., 2009), και ε) στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος και την προστασία του εντερικού βλενογόννου (Kabir et al., 2004; Koenen et al., 2004; Farnell et al., 2006; Chichlowski et al., 2007; Teo and Tan, 2007). Οι κυριότεροι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών είναι:

1. μείωση του pH του εντέρου λόγω παραγωγής οξέων (π.χ. γαλακτικό οξύ)
2. ανταγωνισμός με παθογόνα για θέσεις προσκόλλησης και θρεπτικά συστατικά
3. παραγωγή βακτηριοσινών

4. διέγερση ανοσοποιητικού συστήματος
5. αύξηση παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων, που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Fuller, 1977).

Από την αντίθετη πλευρά, η πρακτική εφαρμογή προβιοτικών μικροοργανισμών στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής περιλαμβάνει αρκετές δυσκολίες, που δεν οφείλονται μόνο στην πολυπλοκότητα του εντερικού οικοσυστήματος των πτηνών (Rehman et al., 2007). Παράγοντες όπως η μικροβιακή σύσταση (μονο- ή πολυστέλεχο), η βιωσιμότητα, το επίπεδο προσθήκης, ο τρόπος εφαρμογής (μέσω νερού ή τροφής), η συχνότητα χορήγησης κ.α. μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα ενός προβιοτικού σκευάσματος (Mountzouris et al., 2010).

### **1.1.2 Βιοενεργές προβιοτικές ουσίες (prebiotics)**

Οι βιοενεργές προβιοτικές ουσίες (ΒΠΟ) είναι συστατικά του σιτηρεσίου που δεν πέπτονται από τον ξενιστή, αλλά έχουν ευεργετική επίδραση με την επιλεκτική αύξηση της ανάπτυξης και της ενεργοποίησης ενός περιορισμένου αριθμού βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας, κυρίως αυτών που παράγουν μικράς αλύσου πτητικά λιπαρά οξέα (ΠΛΟ).

Οι ΒΠΟ έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν την ωφέλιμη μικροχλωρίδα και να αποθαρύνουν των αποίκιση εντερικών παθογόνων. Κάθε συστατικό του σιτηρεσίου που εισέρχεται στο ΓΕΣ είναι εν δυνάμει ΒΠΟ, αλλά για να έχει ευεργετική επίδραση στον ξενιστή, θα πρέπει να δεχθεί τη βακτηριακή ζύμωση (Lan, 2004). Οι ΒΠΟ είναι κυρίως μη πεπτοί ολιγοσακχαρίτες, ειδικά αυτοί που περιέχουν φρουκτόζη, γλυκόζη και μαννόζη (Gibson και Roberfroid, 1995). Το κύριο χαρακτηριστικό των ΒΠΟ είναι ότι αυξάνουν τη συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των μικράς αλύσου ΠΛΟ στο τυφλό έντερο των ορνιθίων, με αποτέλεσμα τη μείωση του pH.

Οι κυριότερες ΒΠΟ που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των πτηνών είναι προϊόντα φρουκτο-ολιγοσακχαριτών (π.χ. ολιγοφρουκτόζη, ινουλίνη). Επιπροσθέτως, έχει διερευνηθεί η δράση και άλλων μορίων όπως είναι οι trans-γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, γλυκο-ολιγοσακχαρίτες, μαλτο-ολιγοσακχαρίτες, ξυλο-

ολιγοσακχαρίτες, η σταχυόζη, η ραφινόζη κ.α. (Monsan και Paul, 1995; Orban et al., 1997; Patterson et al., 1997; Piva, 1998; Collins και Gibson, 1999). Οι μανναν-ολιγοσακχαρίτες, αν και αναφέρονται ως ΒΠΟ, έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης από τους προηγούμενους, καθώς δεσμεύουν και απομακρύνουν παθογόνα βακτήρια από το ΓΕΣ και διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Spring et al., 2000).

Μερικοί μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες, βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των δημητριακών καρπών, έχουν χρησιμοποιηθεί στα σιτηρέσια των πτηνών ως φυτικές ίνες. Οι β-γλουκάνες, εκτός της ζύμωσής τους από τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας, βρέθηκαν ότι προστάτεψαν ορνίθια κρεοπαραγωγής εναντίον της Σαλμονέλας (Lowry et al., 2005).

### 1.1.3 Αιθέρια Έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι περίπλοκα φυσικά μίγματα που μπορεί να περιέχουν 20-60 ενεργά συστατικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Χαρακτηρίζονται από 2 ή 3 βασικά συστατικά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (20-70%) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα συστατικά. Για παράδειγμα, η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι τα βασικά συστατικά του αιθερίου ελαίου *Origanum compactum* σε ποσοστά 30% και 27% αντίστοιχα, η λιναλόλη του *Coriandrum sativum*, η 1,8-σινεόλη (50%) του *Cinnamum camphora*, το α-φαιλλανδρένιο (36%) και το λεμονένιο (31%) των φύλλων και η καρβόνη (58%) και το λεμονένιο (37%) των σπόρων του *Anethum aveolens*, η μενθόλη του *Mentha piperata* κ.ο.κ Τα ενεργά συστατικά αποτελούνται από 2 διαφορετικές βιοχημικές δομές. Η κύρια βιοχημική δομή ενός ενεργού συστατικού συντίθεται από τερπένια και τερπενοειδή και η άλλη από αρωματικά και αλειφατικά συστατικά και χαρακτηρίζονται από μικρά μοριακά βάρη (Bakkali et al., 2008). Τα αιθέρια έλαια είναι χαρακτηριστικά για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (Lee et al., 2004a) και έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια ως πιθανοί αντικαταστάτες των αντιβιοτικών. Οι Lee και Ahn (1998) απέδειξαν ότι η κινναμαλδεΰδη, που προήλθε από αιθέρια έλαια κανέλας, παρεμπόδισε την ανάπτυξη *in vitro* των *Clostridium perfringens* και *Bacteroides fragilis* που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο. Η εφαρμογή των αιθερίων ελαίων στη διατροφή των ορνιθίων βρίσκει υποστηρικτές κυρίως στις χώρες της Μεσογείου, ενώ έχει αναφερθεί η ευεργετική τους επίδραση στην ανάπτυξη

(Giannenas et al., 2003; Lee et al., 2004a,b; Ciftci et al., 2005; Cross et al., 2007; Spornakova et al., 2007; Isabel and Santos, 2009; Mountzouris et al., 2011), στην πέψη (Lee et al., 2003; Hernandez et al., 2004; Jamroz et al., 2005; Mountzouris et al., 2011) και σε παραμέτρους της εντερικής υγείας (Giannenas et al., 2003; Mitsch et al., 2004; Jamroz et al., 2005; Ordonez et al., 2008; McReynolds et al., 2009; Mountzouris et al., 2011). Αν και ο μηχανισμός δράσης των αιθερίων ελαίων δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, μπορεί να συνδέεται με τις λιποφιλικές ιδιότητες και τη χημική δομή των ενεργών συστατικών (Lee et al., 2004b).

#### **1.1.4 Οξινιστές/ Οργανικά οξέα**

Οι οξινιστές χρησιμοποιούνται ευρέως στην πράξη ως συντηρητικά ζωοτροφών, προστατεύοντας τις τροφές από μικροβιακή και μηκυτιακή προσβολή ή αυξάνοντας τη συντηρητική επίδραση ζυμωθέντων ζωοτροφών (π.χ. ενσιρώματα). Επειδή τα οργανικά οξέα έχουν ισχυρή βακτηριοστατική επίδραση, χρησιμοποιούνται ως παράγοντες ελέγχου της Σαλμονέλας στην τροφή και το νερό για τις κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις (Ricke, 2003). Τα πιο συνηθισμένα οργανικά οξέα στη διατροφή των ζώων είναι το κιτρικό, το φουμαρικό, το γαλακτικό, το φορμικό και το βενζοϊκό οξύ. Τα οργανικά οξέα είναι λιποδιαλυτά στην αδιάστατη μορφή τους και μπορούν εύκολα να εισέλθουν στο εσωτερικό των μικροβιακών κυττάρων. Μόλις εισέλθουν, το οργανικό οξύ απελευθερώνει ιόντα H<sup>+</sup> στο αλκαλικό περιβάλλον με αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυτταρικού pH. Το φαινόμενο αυτό, επηρεάζει το μεταβολισμό του μικροοργανισμού, παρεμποδίζοντας τη δράση των μικροβιακών ενζύμων και αναγκάζει το βακτηριακό κύτταρο να χρησιμοποιήσει ενέργεια με σκοπό την αποβολή των ιόντων H<sup>+</sup>, που τελικά οδηγεί στο βακτηριακό θάνατο λόγω πείνας (Collett, 2004).

Γενικά, τα οξυγαλακτικά (προβιοτικά) βακτήρια είναι ικανά να μεγαλώσουν σε χαμηλό pH, που σημαίνει ότι είναι πιο ανθεκτικά στους οξινιστές, σε αντίθεση με άλλα βακτηριακά είδη όπως το *E. coli* και η *Salmonella sp.* Η χρήση των οργανικών οξέων στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής δεν έχει κερδίσει ανάλογη προσοχή με άλλα πρόσθετα, λόγω των περιορισμένων θετικών επιδράσεων στην αύξηση του σωματικού βάρους των πτηνών και τη βελτίωση του ΣΕΤ (Langhout, 2000).



### 1.1.5 Ένζυμα

Η συμπληρωματική προσθήκη ενζύμων στα σιτηρέσια των πτηνών αποτελεί μια τυποποιημένη πρακτική στη σύγχρονη πτηνοτροφία που οφείλεται κυρίως στην αύξηση του κόστους των πρώτων υλών και πιο συγκεκριμένα των πηγών φωσφόρου, ενέργειας και πρωτεϊνών. Η αύξηση της χρησιμοποίησης σιτηρών και υποπροϊόντων ελαιουργίας με χαμηλούς συντελεστές πεπτικότητας έκρινε επιτακτική την ανάγκη για χρησιμοποίηση κατάλληλων ενζύμων στα σιτηρέσια με σκοπό:

1. την αύξηση της διαθεσιμότητας και της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών της τροφής (Classen και Bedford, 1991; Lyons, 1993).
2. τη μείωση της επίδρασης των αντιδιαιτικών παραγόντων όπως οι αραβοξυλάνες, β-γλυκάνες κ.α.
3. τη ρύθμιση της εντερικής μικροχλωρίδας (Engberg et al., 2004).

Τα κυριότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στα σιτηρέσια των ορνιθίων είναι οι υδρολυτικές πρωτεάσες, αμυλάσες, φυτάσες και ένζυμα για τους μη αμυλώδεις παολυσακχαρίτες (ΜΑΠ), όπως η ξυλανάση, η γλυκανάση κ.α. Η αμυλάση χρησιμοποιείται κυρίως σε σιτηρέσια βασισμένα σε καλαμπόκι και σογιάλευρο, για την ενίσχυση των ενδογενών ενζύμων του ζώου με αποτέλεσμα την αύξηση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών (Ferket, 1993). Το φυτικό οξύ είναι ένας αντιδιαιτητικός παράγοντας που βρίσκεται σε όλες τις φυτικές πρώτες ύλες και δεσμεύει δισθενή κατιόντα όπως το ασβέστιο, τον ψευδάργυρο κ.α., αλλά παράλληλα παρεμποδίζει την απορρόφηση των αμινοξέων από το ΓΕΣ των πτηνών. Η συμπληρωματική χορήγηση μιγμάτων ενζύμων, που περιέχουν πρωτεάση και αμυλάση, στα σιτηρέσια των πτηνών βελτίωσε σημαντικά τις αποδόσεις ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Greenwood et al., 2002; Burrows et al., 2002). Η προσθήκη εξωγενούς ενδοξυλανάσης: α) οδήγησε στην αποδόμηση των αραβοξυλάνων του σιτηρεσίου με αποτέλεσμα περισσότερα μόρια ξυλόζης να είναι διαθέσιμα για το ζώο (Odetallah, 2000), β) διάσπασε την ικανότητα συγκράτησης νερού των ΜΑΠ (Scott και Boldaji, 1997) γ) μείωσε το ιξώδες του περιεχομένου του ΓΕΣ (Bedford και Schulze, 1998; Choct et al., 1999). Η μείωση του ιξώδους αυξάνει την έκκριση των ενδογενών ενζύμων και συντελεί στην καλύτερη εκμετάλλευση των θρεπτικών συστατικών της

τροφής (Pawlik et al., 1990). Επίσης, απελευθερώνει θρεπτικά συστατικά (cage effect) προς πέψη από τα ενδογενή ένζυμα (Chesson, 2000).

Αρκετοί ερευνητές έχουν αποδείξει την αλληλεπίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης ενζύμων και της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας. Η προσθήκη ενζύμων για τους ΜΑΠ του σιτηρεσίου μείωσε το μικροβιακό πληθυσμό της μικροχλωρίδας του λεπτού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Choct et al., 1995; Dunn, 1996; Fischer και Classen, 2000). Επίσης, ο Santos (2006) απέδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση μίγματος ενζύμων που περιελάμβανε ενδο-ξυλανάση, αύξησε τη συγκέντρωση των ΜΑΠ που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την ωφέλιμη μικροχλωρίδα.

Από τα προαναφερθέντα παρατηρούμε, ότι υπάρχει μια πληθώρα επιλογών διαφόρων πρόσθετων διατροφής, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, που έχει ως σκοπό την αντικατάσταση των ΑΑΠ και τη διασφάλιση της εντερικής υγείας των πτηνών. Η ορθή επιλογή του κατάλληλου ή των κατάλληλων προσθέτων μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ηλικία του ζώου, η σύσταση του σιτηρεσίου κ.α. Επίσης, η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση 2 ή περισσότερων πρόσθετων διατροφής μπορεί να έχει συνεργική, προσθετική ή ακόμα και ανταγωνιστική δράση, με το αποτέλεσμα να είναι αντίθετο του επιθυμητού. Για την κατανόηση της σπουδαιότητας του ρόλου των προσθέτων στην εντερική υγεία των πτηνών, στη συνέχεια θα αναφερθούν παράμετροι της φυσιολογίας του εντέρου των πτηνών.

## **1.2 Ανάπτυξη του γαστρεντερικού συστήματος των πτηνών**

Το γαστρεντερικό σύστημα των πτηνών αναπτύσσεται σε υψηλούς ρυθμούς κατά την εκκόλαψη. Το βάρος του γαστρεντερικού σωλήνα ως ποσοστό του συνολικού βάρους του ζώου, αυξάνεται από 1% την 17 ημέρα της επώασης σε 3,5% κατά την εκκόλαψη (Uni et al., 2003). Μετά την εκκόλαψη, το γαστρεντερικό σύστημα συνεχίζει να αναπτύσσεται πιο γρήγορα σε σχέση με το βάρος του σώματος λόγω της αύξησης και

της διαφοροποίησης των εντεροκυττάρων (Sell et al., 1991), αν και ο ρυθμός αύξησης διαφέρει στα διάφορα τμήματα του εντέρου (Uni et al., 1999; Sklan, 2001). Το λεπτό έντερο των νεοεκκολαπτόμενων νεοσσών αναπτύσσεται έντονα την περίοδο αμέσως μετά την εκκόλαψη με σκοπό την ωρίμανση, παρόμοια με τα νεογέννητα θηλαστικά (Geyra et al., 2001). Η ωρίμανση περιλαμβάνει μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές τις πρώτες 2 βδομάδες μετά την εκκόλαψη, με έμφαση τις πρώτες 48 ώρες μετά την εκκόλαψη, όπου η διατροφή του νεοσσού μεταφέρεται από τον πλούσιο σε λιπαρά κρόκο σε εξωγενές σιτηρέσιο πλούσιο σε υδατάνθρακες. Τα θρεπτικά συστατικά του σιτηρεσίου διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εντερικού βλεννογόνου του νεοσσού (Noy και Sklan, 1999).

Οι μορφολογικές αλλαγές του εντέρου κατά την ωρίμανση καθορίζονται κυρίως από την ωρίμανση των εντεροκυττάρων και την ανάπτυξη των λαχνών, των κρυπτών και των καλυκοειδών κυττάρων. Την ημέρα της εκκόλαψης, οι εντερικές λάχνες έχουν σχήμα μικρού δακτύλου και η άκρη τους καλύπτεται από ένα στρώμα μη πολωμένων κυβοειδών εντεροκυττάρων. Μέχρι την 10<sup>η</sup> μέρα, οι λάχνες θα μεγαλώσουν και το σχήμα τους θα μετατραπεί σε πλακοειδές, με την επιφάνειά τους να καλύπτεται από πολωμένα εντεροκύτταρα. Οι μακρύτερες λάχνες μπορούν να βρεθούν στο δωδεκαδάκτυλο, που έχουν τουλάχιστον διπλάσιο ύψος από τις λάχνες των υπόλοιπων εντερικών τμημάτων (Baranyiova και Holman, 1976). Η ανάπτυξη των λαχνών του δωδεκαδάκτυλου ολοκληρώνεται την 7<sup>η</sup> μέρα, ενώ οι λάχνες της νήστιδας και του ειλεού συνεχίζουν να αναπτύσσονται και μετά τη 14<sup>η</sup> μέρα (Uni, 1999).

Κατά την εκκόλαψη, κάθε λάχνη ενώνεται με μια κρύπτη. Ο αριθμός των κρυπτών αυξάνεται με υπερπλασία και διακλάδωση και φτάνει τις 3 έως 5 κρύπτες ανά λάχνη την 5<sup>η</sup> μέρα. Το βάθος των κρυπτών και ο αριθμός των εντεροκυττάρων κατά μήκος της λάχνης θα αυξηθεί με την ηλικία, ενώ η πυκνότητα των εντεροκυττάρων θα παραμείνει σταθερή (Jin et al., 1998).

Τα καλυκοειδή κύτταρα προέρχονται από εν δυνάμει βλαστοκύτταρα στη βάση των κρυπτών και διασπείρονται κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου. Η ανάπτυξη των καλυκοειδών κυττάρων του λεπτού εντέρου ξεκινά στο τέλος της εμβρυικής περιόδου και αμέσως μετά την εκκόλαψη. Τα καλυκοειδή κύτταρα είναι μονοκυτταρικοί αδένες που παράγουν γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του γλυκοκάλυκα (Forstner και Forsnter, 1994).

### 1.3 Γλυκοκάλυκας

Η επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα βλέννης που ονομάζεται γλυκοκάλυκας και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του επιθηλίου εναντίον του περιεχομένου του εντερικού αυλού (Forstner και Forstner, 1994). Η κύρια λειτουργία του εντερικού γλυκοκάλυκα θεωρείται η προστασία των εντεροκυττάρων. Τα μόνα κύτταρα που δεν καλύπτονται από βλέννη είναι οι γαστρικοί αδένες που εκκρίνουν υδροχλωρικό οξύ και πεψίνη και οι πλάκες Peyer του εντέρου. Η σύνθεση και το πάχος του γλυκοκάλυκα διαφέρει κατά μήκος του εντέρου. Η ακεραιότητα στη σύσταση και το πάχος του σε κάθε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της έκκρισης και της απομάκρυνσης τμημάτων και διαλυτοποίησης τους στον εντερικό αυλό (Stanley et al., 1986, Robertson et al., 1993). Πιο συγκεκριμένα, ο γλυκοκάλυκας:

I) λειτουργεί ως λιπαντικό και προστατεύει την επιφάνεια του βλεννογόνου από μηχανική καταπόνηση και φυσική φθορά που προκαλείται κατά την πέψη των τροφών (Allen et al., 1982)

II) προστατεύει τους ιστούς από χημική καταπόνηση (ειδικά στο δωδεκαδάκτυλο) από τα διαβρωτικά συστατικά του γαστρικού υγρού όπως το υδροχλωρικό οξύ και η πεψίνη (ο γλυκοκάλυκας βοηθά στην εξουδετέρωση των οξέων του αυλού λόγω της συγκέντρωσης διττανθρακικών αλάτων). Με αυτό τον τρόπο διατηρείται μία βαθμιαία μεταβολή του pH από το χυμό του αυλού στην επιφάνεια του βλεννογόνου (Allen et al., 1982, Atuma et al., 2001)

III) λειτουργεί ως ένα μέσο μεταφοράς των προϊόντων της πέψης που βρίσκονται στον αυλό κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα προς τα επιθηλιακά κύτταρα (Laboisse et al., 1996).

IV) εμποδίζει την προσβολή από εντερικούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Ο γλυκοκάλυκας περιλαμβάνει τις κατάλληλες θέσεις προσκόλλησης για τις λεκτίνες της ενδογενούς μικροχλωρίδας και παρεμποδίζει την προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων (Forstner και Forstner, 1994).

Το πάχος της βλέννης ποικίλει στα διάφορα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα και κυμαίνεται από 700μm στο στόμαχο και το παχύ έντερο σε 150-300 μm στο λεπτό έντερο. Επιπλέον, αποτελείται από δύο επίπεδα:

- Ένα λεπτό εσωτερικό στρώμα, το οποίο είναι δύσκολο να αποκολληθεί και είναι στείρο μικροοργανισμών, και
- Ένα παχύ εξωτερικό στρώμα, το οποίο είναι περισσότερο εύκολο να διασκορπιστεί και δεν είναι στείρο.

Στο λεπτό έντερο η εσωτερική στρώση είναι πολύ πιο λεπτή σε σύγκριση με το παχύ, χαρακτηριστικό που ίσως χρειάζεται για να διευκολύνεται η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (McGuckin et al., 2011).

Το βασικό συστατικό του γλυκοκάλυκα είναι το νερό ( $\approx 95\%$ ), αλλά περιλαμβάνει επίσης άλατα, λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πρωτεΐνες με αμυντικές ιδιότητες όπως η λυσοζύμη, ανοσοσφαιρίνες κ.α.. Όμως, το κυριότερο δομικό συστατικό της βλέννης του γλυκοκάλυκα είναι οι γλυκοπρωτεΐνες (σύνθετες πρωτεΐνες που το μη πρωτεϊνικό τμήμα τους είναι υδατάνθρακας) ή βλενοπρωτεΐνες ή βλεννίνες (Bansil και Tumer, 2006).

## 1.4 Βλενοπρωτεΐνες

Οι εντερικές γλυκοπρωτεΐνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους (μέχρι  $25 \times 10^6$  Da) που παράγονται, αποθηκεύονται και εκκρίνονται από τα καλυκοειδή κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Αποτελούν μία από τις πιο σύνθετες κατηγορίες μορίων που έχουν περιγραφεί και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να μελετηθούν λόγω: α) του μεγάλου μεγέθους τους, β) της μεγάλης δομικής τους ποικιλομορφίας και γ) της υψηλής περιεκτικότητας τους σε υδατάνθρακες. (Forstner και Forstner, 1994; Walker-Nasir et al., 2003).

Με βάση την *in vivo* τοποθεσία τους μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις φάσεις (Allen & Pearson 1993):

- (1) βλενοπρωτεΐνες που δεν έχουν εκκριθεί ακόμα και βρίσκονται αποθηκευμένες στα καλυκοειδή κύτταρα

(2) ένα στρώμα ζελατινοποιημένων βλεννοπρωτεϊνών προσκολλημένων στο γαστρεντερικό επιθήλιο (βασικός προστατευτικός φραγμός) και

(3) διαλυτές βλεννοπρωτεΐνες που αναμειγνύονται με τα υπόλοιπα περιεχόμενα του εντερικού αυλού.

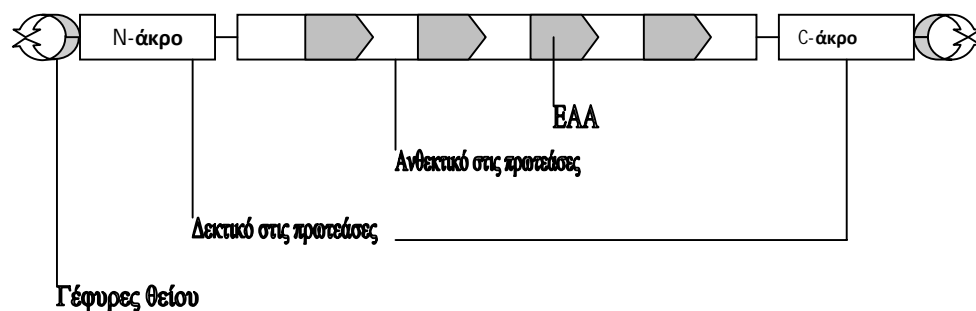
Εξαιτίας της πολυπλοκότητας και του μεγάλου μεγέθους του μορίου τους, υπάρχουν διάφορες κατηγορίες κατάταξης των βλεννινών. Για παράδειγμα, οι βλεννοπρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες ανάλογα με το πρωτεϊνικό τους προϊόν: στις ζελατινοποιημένες, στις διαλυτές και στις βλεννίνες που είναι συνδεδεμένες στις μεμβράνες (Smirnov et al., 2004). Μέχρι σήμερα, ένας ικανοποιητικός αριθμός γονιδίων (από MUC1 έως MUC21) έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο και στους επίμυες (Perez-Vilar και Hill, 1999; Dekker et al., 2002). Τα γονίδια των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών που έχουν ερευνηθεί περισσότερο είναι τα MUC2, MUC5AC, MUC5B και MUC6 που αποτελούν βασικά συστατικά του γλυκοκάλυκα. Από την άλλη πλευρά, τα γονίδια MUC1, MUC3A και MUC3B είναι αντιπροσωπευτικά των βλεννινών που προσκολλούνται στις κυτταρικές μεμβράνες, με το ρόλο τους να μην έχει πλήρως διευκρινιστεί (Dharmani et al., 2008). Αν το κριτήριο διαφοροποίησης είναι η σύσταση του μη πρωτεϊνικού (υδατανθρακικού) τμήματος, οι βλεννίνες μπορούν να διαχωριστούν σε ουδέτερες, όξινες ή σιαλο-βλεννίνες και θειο-βλεννίνες (Sharma et al., 1997). Παρ' όλη την πολυπλοκότητα του μορίου, οι βλεννοπρωτεΐνες έχουν μερικές βασικές αρχές δόμησης.

#### **1.4.1 Δομή βλεννοπρωτεϊνών**

Το μόριο των βλεννοπρωτεϊνών συντίθενται από ένα αριθμό μονομερών κάθε ένα εκ των οποίων αποτελείται από 20% πρωτεΐνη και 80% υδατάνθρακες. Κάθε μονομερές ενώνεται με μία κεντρική πρωτεΐνη (πρωτεϊνικός σκελετός - πυρήνας ή κορμός) με ένα ή περισσότερους δεσμούς μεταξύ ατόμων θείου, που αναφέρονται ως “γάφυρες θείου” (disulphide bridges, Corfield και Warren, 1996). Στις βλεννοπρωτεΐνες του λεπτού εντέρου χοίρου με μοριακό βάρος  $1,7 \times 10^6$  Da, μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος  $9 \times 10^5$  Da ενώνεται με 7 ή 8 ισομεγέθη μονομερή μέσω ατόμων θείου. Αυτή η δομή είναι γνωστή με τον όρο ‘ανεμόμυλος’ (windmill model, Allen et al., 1982).

Ο πρωτεϊνικός σκελετός των βλεννινών (σύνολο μέχρι 4.500 αμινοξέα, Forstner και Forstner, 1994) μπορεί να χωριστεί σε 2 τμήματα. Το πρώτο τμήμα, που αποτελείται από μία υψηλού βαθμού γλυκοσυλίωση αλληλουχία αμινοξέων, πλούσια σε σερίνη, θρεονίνη και προλίνη. Το τμήμα αυτό είναι ανθεκτικό στην πρωτεόλυση λόγω των ολισσακαρικών αλυσίδων (Allen και Pearson, 1993) και χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών αμινοξέων (EAA, tandem repeats). Η μικρή παραλλαγή των EAA μιας βλεννοπρωτεΐνης δίνει τη δυνατότητα να αποκρυπτογραφηθούν διάφορα γονίδια, ενώ το μήκος και το μοριακό βάρος των βλεννοπρωτεϊνικών πεπτιδίων εξαρτώνται από τον αριθμό των EAA. Για παράδειγμα το γονίδιο MUC2, όπου η αλληλουχία των αμινοξέων έχει πλήρως αποκρυπτογραφηθεί (Gum et al., 1994) έχει EAA με 23 αμινοξέα, με το αμινοξύ θρεονίνη να βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία και μέχρι 70% ( Forstner και Forstner, 1994).

Το δεύτερο τμήμα του πρωτεϊνικού σκελετού είναι μερικώς ή καθόλου γλυκοσυλιωμένο, πλούσιο σε κυστεΐνη και διασπάται εύκολα από πρωτεάσες. Αυτά τα πεπτίδια βρίσκονται στα αμίνιο (N) και καρβόξυ (C) τελικά άκρα κάθε μονομερούς. Δύο ή περισσότερα μονομερή ενώνονται μεταξύ τους με ‘γέφυρες θείου’ και σχηματίζουν ολιγομερή. Τα τελευταία με τη σειρά τους ενώνονται με ‘γέφυρες θείου’ στο κύριο πρωτεϊνικό σκελετό (Strous και Dekker, 1992).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση ενός μονομερούς

Εκτός από το πρωτεϊνικό τμήμα των βλεννοπρωτεϊνών, το υπόλοιπο 80% απαρτίζεται από το υδατανθρακικό τμήμα, που προσδίδει και τις βιοχημικές ιδιότητες του μορίου.

Οι μονοσακχαρίτες συνδέονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς στα μονομερή διαμορφώνοντας πολύπλοκες πλευρικές αλυσίδες γύρω από την κεντρική πρωτεΐνη. Η σύνθεση και το μέγεθος κάθε ολιγοσακχαρικής αλυσίδας ποικίλει ανάλογα με την προέλευση των βλεννοπρωτεϊνών, π.χ. οι βλεννοπρωτεΐνες του λεπτού εντέρου του χοίρου έχουν 6-8 μονοσακχαρίτες ανά αλυσίδα, σε αντίθεση με τις γαστρικές βλεννίνες του χοίρου και του ανθρώπου και τις βλεννίνες στο ανθρώπινο κόλον που απαρτίζονται από 19, 19 και 12 σάκχαρα ανά αλυσίδα αντίστοιχα (Slomiany και Meyer, 1973; Allen et al., 1982). Οι κυριότεροι μονοσακχαρίτες που σχηματίζουν τις υδατανθρακικές αλυσίδες των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών είναι η γαλακτόζη (Γαλ), η N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη (ΝακΓαλ), η N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (ΝακΓλκ) και η Φουκόζη (Φουκ). Επιπροσθέτως, το N-ακετυλ-νευραμινικό οξύ (ΝακΝευ) και οι εστέρες θεικών ριζών έχουν εντοπιστεί στο άκρο των αλυσίδων, δίνοντας αρνητικό φορτίο στο μόριο μιας βλεννοπρωτεΐνης. Το αρνητικό φορτίο προστατεύει το μόριο των βλεννοπρωτεϊνών από την αποδόμηση που οφείλεται στα πρωτεολυτικά και γλυκολυτικά ένζυμα που βρίσκονται στο γλυκοκάλυκα (Corfield et al., 1992). Επίσης, οι βλεννοπρωτεΐνες που περιέχουν σιαλικό οξύ (N-ακετυλ-Νευραμινικό οξύ) και θεικές ρίζες έχουν αυξημένη οξύτητα με αποτέλεσμα τη διαφορετική ιστολογική χρώση του εντερικού επιθηλίου (Theodoropoulos et al., 2005). Στον Πίνακα 1 αναφέρεται η σύνθεση των μονοσακχαριτών των υδατανθρακικών αλυσίδων των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών.

Πίνακας 1.4.1.α. Σύσταση (ως % των συνολικών υδατανθράκων) των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών

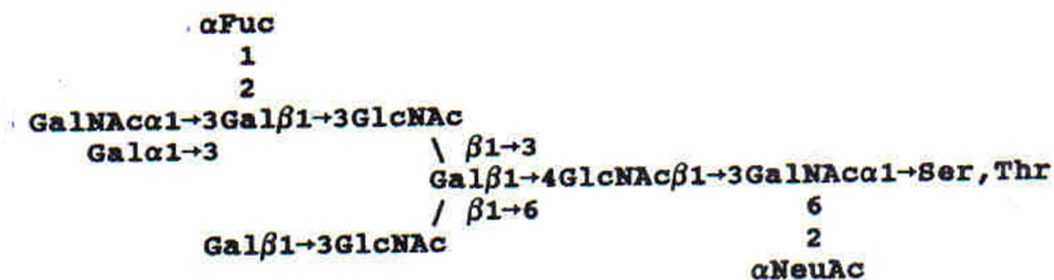
Είδος Ζώου	Γαλ	Φουκ	ΝακΓαλ	ΝακΓλκ	ΝακΝευ	Βιβλιογραφική πηγή
Μοσχάρι	42.1	4.7	23.6	24.1	2.4	Montagne et al., 2000
Επίμυς	35.1	5.7	23.0	26.1	15.0	Shub et al, 1983
Κουνέλι	23.9	9.5	33.8	25.6	7.2	Mantle and Husar, 1994
Άνθρωπος	20.7	16.6	27.8	22.6	12.3	Mantle and Husar, 1994
Χοίρος	15.1	16.9	29.1	16.1	22.7	Allen et al., 1982

Γαλ: Γαλακτόζη, Φουκ: Φουκόζη, ΝακΓαλ: N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη, ΝακΓλκ: N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη, ΝακΝευ: N-ακετυλ-νευραμινικό οξύ.



Πιο αναλυτικά, μια υδατανθρακική πλευρική αλυσίδα αποτελείται από τρία τμήματα: α) ένα αναγωγικό άκρο όπου ένα μόριο ΝακΓαλ ενώνεται με μία Ο-γλυκοσυλιωμένη σερίνη και/ή θρεονίνη στο κύριο πρωτεϊνικό σκελετό της βλεννοπρωτεΐνης β) ένα βασικό τμήμα με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Γαλ και ΝακΓλκ που ενώνονται μεταξύ τους με β-γλυκοζιδικούς δεσμούς και γ) ένα μη αναγωγικό άκρο όπου οι τελικοί μονοσακχαρίτες ενώνονται με α-γλυκοζιδικούς δεσμούς με τους υπόλοιπους μονοσακχαρίτες της υδατανθρακικής αλυσίδας όπως τη Γαλ και τη ΝακΓλκ. Στις εντερικές βλεννοπρωτεΐνες του ανθρώπου η Φουκ, το ΝακΝευ, η ΝακΓαλ και η Γαλ φαίνεται να είναι οι τελικοί ακραίοι μονοσακχαρίτες. Οι δομές των πλευρικών αλυσίδων που έχουν ως ακραίο μονοσακχαρίτη την ΝακΓαλ, τη Γαλ και τη Φουκ είναι γνωστά σαν αντιγόνα αίματος Α, Β και Η αντίστοιχα (Hoskins και Boulding, 1976). Στην εικόνα που ακολουθεί, παρουσιάζεται μια τυπική υδατανθρακική αλυσίδα με δομές αντιγόνων αίματος.

Αναλυτικότερα, η σύνδεση των ολιγοσακχαρικών αλυσίδων στον πεπτιδικό σκελετό γίνεται ανάμεσα στη ΝακΓαλ και στο υδροξύλιο της σερίνης ή της θρεονίνης και έτσι σχηματίζονται τα προαναφερόμενα μονομερή τα οποία με τη σειρά τους συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς στο κύριο πεπτιδικό κορμό και σχηματίζουν το μόριο της βλενίνης (Stous και Dekker, 1992).



Εικόνα 2. Τυπική υδατανθρακική αλυσίδα εντερικής βλεννοπρωτεΐνης που έχει απομονωθεί από το ανθρώπινο κόλον, παρουσιάζοντας τα αντιγόνα αίματος Α (GalNac: N-ακετυλ-Γαλακτοζαμίνη), Β (Gal: Γαλακτόζη) και Η (Fuc: Φουκόζη). Στο σχήμα φαίνεται ο δεσμός μιας N-ακετυλ-Γαλακτοζαμίνης (GalNac) με μία σερίνη (Ser) ή θρεονίνη (Thr), οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Γαλακτόζης (Gal) και N-ακετυλ-Γλυκοζαμίνης (GlcNAc) και οι τελικοί μονοσακχαρίτες Γαλακτόζη, N-ακετυλ-Γαλακτοζαμίνη, Φουκόζη και N-ακετυλ-Νευραμινικό οξύ (NeuAc, Hoskins, 1992).

Εκτός από τις Ο-γλυκοσυλιωμένες θέσεις προσκόλλησης των ολιγοσακχαριτών στον πρωτεϊνικό πυρήνα των βλεννοπρωτεϊνών, η μαννόζη (Man) μπορεί να

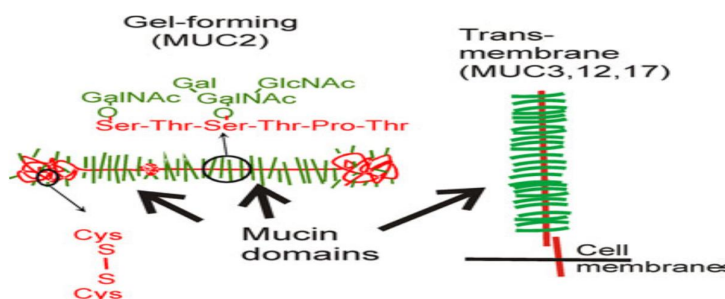
προσκολληθεί μέσω της N-γλυκοσυλίωσης σε μία ασπαραγίνη μιας αλληλουχίας αμινοξέων. Ποσοτικά, οι N-γλυκάνες αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των υδατανθράκων των βλεννινών. Μικρές ποσότητες Μαν έχουν ανιχνευτεί στις εντερικές βλεννοπρωτεΐνες μοσχαριού, επίμου, ανθρώπου και κουνελιού (3%, 0.4%, ίχνη και ίχνη αντίστοιχα), και για αυτό το λόγο η δομή των N-γλυκοσυλιωμένων βλεννοπρωτεϊνών δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Forstner και Forstner, 1994).

Εκτός από το υδατανθρακικό τμήμα των βλεννοπρωτεϊνών, το υπόλοιπο 20% απαρτίζεται από το πρωτεϊνικό τμήμα, που σχηματίζει και το βασικό σκελετό της δομής του μορίου.

#### **1.4.2 Γονιδιακή έκφραση βλεννοπρωτεϊνών**

Μέχρι σήμερα περισσότερα των 20 διαφορετικών γονιδίων που εκφράζουν τις βλεννίνες έχουν ταυτοποιηθεί και ταξινομηθεί με αύξοντα αριθμό, από MUC1 έως MUC 21, σύμφωνα με τη σειρά ανακάλυψής τους (Kim και Ho, 2010). Με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων που χαρακτηρίζει τα παραπάνω μόρια, διακρίνονται δύο τύποι βλεννινών (Εικ. Α): οι βλεννίνες που έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν γέλη και κωδικοποιούνται από τα γονίδια MUC2, MUC5AC, MUC5B και MUC6 και οι βλεννίνες που συνδέονται στις κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16, και MUC17 και καλύπτουν την επιφάνεια των εντερικών κυττάρων (ή άλλων επιθηλιακών κυττάρων).

Οι διαμεμβρανικές βλεννίνες (transmembrane mucins) έχουν χαρακτηριστική κυτταροπλασματική ουρά και μία τεράστια εξωκυτταρική περιοχή, της οποίας η μάζα μπορεί να είναι πάνω από  $10^6$  Da, με εξαίρεση το γονίδιο MUC13, το οποίο είναι σαφώς μικρότερο σε μέγεθος. Ο πεπτιδικός κορμός των MUC 3, MUC 12 και MUC 17 απαριθμεί 4.000-5.000 αμινοξέα, τα οποία αποτελούνται κυρίως από σερίνη και θρεονίνη. Μορφολογικά ο πεπτιδικός κορμός των ανωτέρω έχει μήκος περίπου 0,8μm και είναι στενά «συσκευασμένος». Όσον αφορά τη λειτουργικότητα αυτών των βλεννινών, προκαταρκτικές μελέτες κυρίως στον ανθρώπινο οργανισμό υποδεικνύουν ότι τα γονίδια MUC3, MUC12 και MUC17 είναι τα κύρια συστατικά του εντερικού γλυκοκάλυκα, ενώ το γονίδιο MUC3 εντοπίζεται επίσης και στο εντερικό επιθήλιο και θεωρείται ότι συμβάλει στη προστασία του (Johansson et al., 2011).



Εικόνα 3. Κατηγορίες βλεννοπρωτεϊνών ανάλογα με τις φυσικές τους ιδιότητες (ζελατοποιημένες ή προσκολλημένες στις κυτταρικές μεμβράνες, Johansson et al., 2011).

Αναφορικά με τις βλεννίνες που σχηματίζουν το γλυκοκάλυκα, το γονίδιο MUC2 θεωρείται ως η κυριότερη βλεννοπρωτεΐνη. Αρχικά, αποτελεί κύριο συστατικό μέρος του γλυκοκάλυκα που καλύπτει το επιθήλιο του λεπτού και του παχέος εντέρου και δεύτερον, εκτίθεται στις δυσμενείς συνθήκες του εντερικού αυλού. Πρόσφατες έρευνες σε ποντίκια αναφέρουν ότι το μόριο της MUC2 χαρακτηρίζεται από μία πολύ καλά οργανωμένη δομή η οποία δεν χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα αλλά μορφοποιείται σε ένα μεγάλο διασυνδεδεμένο δίκτυο με ενδογενείς βιοχημικές αλληλεπιδράσεις και ιδιότητες. Έξι διαφορετικοί τύποι ομοιοπολικών και μη αλληλεπιδράσεων έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα στο μόριο της βλεννίνης MUC2 (Ambort et al., 2012).

Πίνακας 1.4.2.α. Γονιδιακή έκφραση βλεννοπρωτεϊνών ανάλογα με το μέρος του γαστρεντερικού τμήματος που απαντώνται (McGuskin et al., 2011).

Ιστός	Βλεννίνες με μορφή γέλης	Διαμεμβρανικές βλεννίνες
Στοματική κοιλότητα	MUC5B, MUC7, MUC19	MUC1, MUC4, MUC16
Στομάχι	MUC5AC, MUC6	MUC1, MUC16
Λεπτό έντερο	MUC2	MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17

<b>Παχύ έντερο</b>	MUC2, MUC5AC, MUC6	MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17
--------------------	--------------------	---

### 1.4.3 Βιοσύνθεση βλεννοπρωτεϊνών

Η βιογένεση των βλεννοπρωτεϊνών αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία καθώς ξεκινά από τη μεταγραφή του γονιδίου των βλεννινών και τη μετάφραση του mRNA, συνεχίζεται με τον ολιγομερισμό των πεπτιδίων, την N- και O-γλυκοσυλίωση και ολοκληρώνεται με την ενδοκυτταρική αποθήκευση και τη συστηματική ή ακανόνιστη έκκρισή τους από τα καλυκοειδή κύτταρα (Strous και Dekker, 1992).

Ο πρωτεϊνικός σκελετός των βλεννοπρωτεϊνών συντίθεται ως αρχικά πεπτίδια από τα ριβοσώματα. Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης τα πεπτίδια μεταφέρονται δια μέσω της μεμβράνης στο περιεχόμενο του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΑΕΔ) και στη συνέχεια προς τα σύμπλοκα Golgi. Οι τροποποιήσεις του μορίου μετά τη μεταγραφή των βλεννοπρωτεϊνών, όπως είναι η αναδίπλωση και ο ολιγομερισμός, πραγματοποιούνται κυρίως στο ΑΕΔ. Οι υπόλοιπες τροποποιήσεις, όπως η προσθήκη πλευρικών υδατανθρακικών αλυσίδων, εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής και συνεχίζονται μέχρι τα μόρια να απομακρυνθούν από το δίκτυο trans-Golgi προς την προγραμματισμένη τους κατεύθυνση (Forstner and Forstner, 1994).

Μετά τη σύνθεση των αρχικών πεπτιδίων ξεκινά η διαδικασία της N-γλυκοσυλίωσης με τη μεταφορά ενός ολιγοσακχαρίτη, πλούσιου σε μαννόζη (Γλκ<sub>3</sub>Μαν<sub>9</sub>ΝακΓλκ<sub>2</sub>), στο αμινοξύ ασπαραγίνη, αρκεί η τελευταία να είναι μέρος της αλληλουχίας ασπαραγίνη-X-σερίνη ή ασπαραγίνη-X-θρεονίνη, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός της προλίνης ή του ασπαραγινικού οξέος (Imperiali και O'Connor, 1999). Ύστερα από την ολοκλήρωση της σύνθεσης των πολυπεπτιδίων και της N-γλυκοσυλίωσης, το μόριο μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου ξεκινά η διαδικασία της τελικής N-γλυκοζυλίωσης. Κατά τη διάρκειά της, όλα τα μόρια Γλκ και 4 μόρια Μαν απομακρύνονται από αντίστοιχες γλυκοσιδάσες, και μόρια ΝακΓλκ προστίθενται στον ολιγοσακχαρίτη. Τελικά δημιουργείται ένας εξασακχαρίτης που αποτελείται από 3 μόρια Μαν και 3 μόρια ΝακΓλκ, που δέχεται την περαιτέρω επίδραση ενός μεγάλου

αριθμού γλυκοσυλ-τρασφερασών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πιο πολύπλοκης δομής N-γλυκοσυλιωμένων ολιγοσακχαριτών (Strous και Dekker, 1992).

Ταυτόχρονα με τη N-γλυκοσυλίωση, στο σύμπλεγμα Golgi λαμβάνει χώρα και η O-γλυκοσυλίωση των βλεννοπρωτεϊνών. Κατά την έναρξη της O-γλυκοσυλίωσης, μόρια ΝακΓαλ συνδέονται με τη βοήθεια ΝακΓαλ-τρασφερασών σε υδροξυλιωμένα μόρια θρεονίνης ή σερίνης. Δεν έχει παρατηρηθεί να είναι απαραίτητη κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων για την O-γλυκοσυλίωση, παρόλα αυτά η παρουσία της προλίνης δίπλα στη σερίνη ή θρεονίνη, αυξάνει την αποτελεσματικότητα των ΝακΓαλ-τρασφερασών (Strous και Dekker, 1992; Wopereis et al., 2006). Η O-γλυκοσυλίωση ολοκληρώνεται όταν μόρια ΝακΝευ, Φουκ και θειικών ριζών προστίθενται ως τελικοί/ακριανοί μονοσακχαρίτες (Forstner and Forstner, 1994).

#### **1.4.4 Αποθήκευση και έκκριση βλεννοπρωτεϊνών**

Όταν η διαδικασία της γλυκοσυλίωσης ολοκληρωθεί, οι βλεννοπρωτεΐνες συγκεντρώνονται σε διογκωμένους όζους (nodular dilatations) κατά μήκος σωληνοειδών κατασκευών του trans-τμήματος των στοιβάδων Golgi. Στη συνέχεια, οι όζοι ξεκινούν το σχηματισμό δομών συμπυκνωμένων κόκκων και ξεκινά η ωρίμανσή τους. Η συμπύκνωση των βλεννοπρωτεϊνών συνοδεύεται από την αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων  $Ca^{2+}$ , όπου συμβάλει στην θωράκιση των αρνητικά φορτισμένων βλεννοπρωτεϊνών. Σε συνδυασμό με τα ιόντα  $Ca^{2+}$ , άλλοι παράγοντες στο εσωτερικό των κοκκιωδών σχηματισμών μπορεί να είναι απαραίτητοι για τη σταθεροποίηση της συμπύκνωσης των βλεννινών αυξάνοντας τη συγγένεια μεταξύ πολυμερών (Forstner και Forstner, 1994). Η τελευταία είναι απαραίτητη για την αποθήκευση των βλεννοπρωτεϊνών στον τελικό τους προορισμό, τα καλυκοειδή κύτταρα (Paz et al., 2003).

Η έκκριση της βλέννης από τα καλυκοειδή κύτταρα γίνεται μέσω της εξωκύττωσης. Η διαδικασία ξεκινά με τη συγχώνευση των κοκκιωδών δομών και των κυτταρικών μεμβρανών με τη βοήθεια συγκεκριμένων πρωτεϊνών προσκόλλησης (Forstner και Forstner, 1994). Δύο διακριτές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά την έκκριση των βλεννοπρωτεϊνών, η βασική έκκριση (baseline secretion) και η συνδυασμένη εξωκύττωση (compound exocytosis). Η βασική έκκριση, ή απλή

εξωκύτωση, απελευθερώνει συνεχώς φρεσκοπαραγόμενα μόρια βλεννοπρωτεϊνών που μετακινούνται κατά μήκος της περιφέρειας της εξωτερικής στοιβάδας των κόκκων (Forstner και Forstner, 1994; Deplanke και Gaskins, 2001). Κατά τη διάρκεια της βασικής έκκρισης, τα καλυκοειδή κύτταρα υφίστανται συνδυασμένη εξωκύτωση, επιταχύνοντας την έκκριση με αποτέλεσμα την έντονη απελευθέρωση των κεντρικά αποθηκευμένων βλεννοπρωτεϊνών (Deplanke και Gaskins, 2001). Ένα ευρύ φάσμα παραγόντων που δρουν ως υποδοχείς μπορούν να απελευθερώσουν βλεννοπρωτεΐνες στην επιφάνεια του βλεννογόνου, όπως ορμόνες νευροπεπτίδια και άλλες ουσίες του ξενιστή ή βακτηριακής προέλευσης (Forstner και Forstner, 1994). Παρόλο που η αρχιτεκτονική οργάνωση των καλυκοειδών κυττάρων και των βλεννοπρωτεϊνών είναι ευρέως γνωστά, χρειάζεται περισσότερη έρευνα για τον τρόπο που συμβάλλουν οι προαναφερθέντες παράγοντες στην ανομοιογένεια των βλεννοπρωτεϊνών και τη διαφοροποίηση των αρχικών βλαστικών κυττάρων σε καλυκοειδή κύτταρα (Forder, 2007).

## **1.5 Σχέση βλεννοπρωτεϊνών και μικροοργανισμών**

Τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή ή την ποσότητα του γλυκοκάλυκα στα διάφορα στάδια της σύνθεσης επιδρώντας, είτε στον πολλαπλασιασμό και τη μορφολογία των καλυκοειδών κυττάρων (Meslin et al., 1999) είτε στη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών (Smirnova et al., 2003). Παρ' όλα αυτά, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν τέτοιες αλλαγές. Περαιτέρω έρευνα θα δώσει περισσότερες πληροφορίες για το αν οι αλλαγές οφείλονται μόνο στο βακτηριακό αποικισμό ή σε συνεργασία με αλλαγές στο περιεχόμενο του εντερικού αυλού, όπως μια ενδεχόμενη μείωση του pH λόγω βακτηριακών μεταβολικών λειτουργιών (Forder, 2007).

### **1.5.1 Βακτηριακή προσκόλληση στις βλεννοπρωτεΐνες**

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και βακτηριακών πληθυσμών είναι περίπλοκες καθώς περιλαμβάνουν τη βακτηριακή προσκόλληση σε συγκεκριμένες

θέσεις κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι βλεννοπρωτεΐνες μπορούν να παρεμποδίσουν την προσκόλληση βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα, δρώντας ανταγωνιστικά μέσω των πλευρικών υδατανθρακικών αλυσίδων. Οι ολιγοσακχαρίτες με τη σειρά τους, παρέχουν θέσεις προσκόλλησης για μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών όπως τοξίνες, ορμόνες και αντισώματα (Freitas et al., 2002). Επίσης, η ποικιλομορφία των υδατανθρακικών αλυσίδων των βλεννινών παρέχουν μια μεγάλη δεξαμενή διαθέσιμων θέσεων προσκόλλησης για ωφέλιμα και παθογόνα βακτήρια αλλά και υπόστρωμα για τη δράση βακτηριακών γλυκοσιδασών κ.α. (Forstner και Forstner, 1994).

Η εντερική μικροχλωρίδα έχει την ικανότητα να αποικεί στο εντερικό βλεννογόνο με συγκεκριμένες ιδιότητες προσκόλλησης όπως οι δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδροφοβικές στερεοχημικές δυνάμεις κ.α. (Forder 2007). Χρησιμοποιώντας αυτές τις ιδιότητες τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν τους μονοσακχαρίτες των πλευρικών αλυσίδων ως υποδοχείς στην επιφάνεια του γλυκοκάλυκα και/ή των κυτταρικών μεμβρανών του γαστρεντερικού σωλήνα (Sharma et al., 1997).

Διαφορετικά βακτηριακά είδη έχουν συγκεκριμένη 'προτίμηση' για διαφορετικά σάκχαρα. Για παράδειγμα, το γένος *Lactobacillus animalis* έχει θέσεις προσκόλλησης για την γλυκόζη και/ή τη Μαν, ενώ η προσκόλληση του *Lactobacillus fermentum* στον εντερικό γλυκοκάλυκα μειώθηκε με την προσθήκη ΝακΝευ ή Μαν (Gusils et al., 2003). Στον πίνακα 1.5.1.α παρουσιάζονται σάκχαρα βλεννοπρωτεϊνών ως πιθανοί υποδοχείς για προσκόλληση συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών (Forstner και Forstner, 1994; Vimal et al., 2000; Gusils et al., 2003; Forder, 2007).

Πίνακας 1.5.1.α. Πιθανοί υποδοχείς για βακτηριακή προσκόλληση

<b>Υποδοχέας/ Σάκχαρο</b>	<b>Βακτήριο</b>
Γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν Μαν από γλυκοκάλυκα του κόλον ποντικών	<i>E. coli</i> από ανθρώπινα περιττώματα
Υποδοχείς D-γαλακτοζαμίνης	<i>E. coli</i> K12

Υποδοχείς Γαλ-ΝακΓαλ	<i>Entamoeba histolytica</i>
Γαλβ1,3ΝακΓλκ & Γαλβ1,4ΝακΓλκ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν ΝακΓλκ	Είδη από <i>Pseudomonas ceracia</i>
Γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν ΝακΝευ	<i>E. coli</i>
Μαν από ουδέτερες βλεννίνες με MB 250kDa	<i>Salmonella typhimurium</i>
Γλκ & Μαν	<i>L. animalis</i> CRL 1014

ΝακΓαλ: N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη, ΝακΓλκ: N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη, Γαλ: Γαλακτόζη, Μαν: Μαννοζη, Φουκ: Φουκόζη, MB: Μοριακό Βάρος

Διαφορετικά είδη βακτηρίων παρουσιάζουν μια υψηλή τάση να ανταγωνίζονται για συγκεκριμένες θέσεις προσκόλλησης. Για παράδειγμα, προβιοτικοί μικροοργανισμοί, όπως είδη του γένους *Bifidobacterium sp.*, μπορούν να προσκολληθούν στο γλυκοκάλυκα ή/και στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, εμποδίζοντας την προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων. Το τελευταίο μπορεί να επιτευχθεί είτε μειώνοντας το pH, είτε από την παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού όπως το οξικό και το γαλακτικό οξύ, είτε από την παραγωγή παρεμποδιστών όπως βακτηριοσίνες (Kleesen et al., 2003). Άλλες έρευνες έδειξαν ότι είδη όπως το *L. fermentum spp cellobiosus* και το *L. casei* μπορούν να προσκολληθούν σε υποδοχείς του γλυκοκάλυκα και των επιθηλιακών κυττάρων, εμποδίζοντας την προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων (Gusils et al., 2002), ενώ η προσθήκη οξυγαλακτικών βακτηρίων σε *in vitro* καλλιέργειες μείωσαν τα επίπεδα προσκόλλησης του *E. coli* σε επιθηλιακά κύτταρα (Gusils et al., 2003). Παρ' όλα αυτά, αντίστοιχα πειράματα με Σαλμονέλλα, έδειξαν ότι η προσκόλληση ειδών *Salmonella sp.* στο γλυκοκάλυκα ή στα επιθηλιακά κύτταρα, δεν επηρεάζεται από την προσθήκη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Gusils et al., 2003).

### 1.5.2 Βακτηριακή αποδόμηση των βλεννοπρωτεϊνών του γλυκοκάλυκα



Η βακτηριακή αποδόμηση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία με αρκετά βήματα όπως η διάσπαση του πολυπεπτιδικού δεσμού από πρωτεάσες του ξενιστή και διάφορων μικροοργανισμών, υδρόλυση των τερματικών ολιγοσακχαριτών από βακτηριακές γλυκοσιδάσες και διάσπαση των Ο-ακετυλ και Ο-θειϊκών εστέρων των μονοσακχαριτών από βακτηριακές εστεράσες. (Hoskins 1992).

**Αποδόμηση πρωτεϊνικού τμήματος:** οι πεπτιδικοί δεσμοί διασπώνται από την πεψίνη, τις μικροβιακές και παγκρεατικές πρωτεάσες ενώ οι δεσμοί μεταξύ μορίων θείου που ενώνουν το γλυκοσυλιωμένο με το μη γλυκοσυλιωμένο τμήμα διασπώνται από παράγοντες όπως η Ν-ακετυλο-κυστεΐνη και η μερκαπτο-αιθανόλη (Hoskins 1993).

**Αποδόμηση των ολιγοσακχαριδικών αλυσίδων:** τα εντερικά βακτήρια, και όχι ο ξενιστής, παράγουν γλυκοσιδάσες που καταλύουν την υδρόλυση των ολιγοσακχαριτών στον εντερικό αυλό. Τα στελέχη που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί αφορούν κυρίως τα είδη *Ruminococcus torques*, *R. granus* και *Bifidobacterium* spp. Έχουν την ικανότητα να παράγουν μόνο τα απαραίτητα ένζυμα τα οποία απελευθερώνουν εξωκυτταρικά στο περιβάλλον ενώ δεν έχει ανιχνευτεί ενεργότητα πρωτεασών από αυτά. Τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι οι μονοσακχαρίτες Γαλ, Φουκ, ΝακΓαλ και ΝακΓλκ και οι δισακχαρίτες Γαλβ3ΝακΓαλ και Γαλβ3ΝακΓλκ.

**Διάσπαση των δεσμών Ο-ακετυλ και Ο-θειϊκού οξέος των εστέρων των ολιγοσακχαριτών:** εστέρες του οξικού οξέος εμφανίζονται στις θέσεις 4, 7, 8, 9 του άνθρακα του σιαλικού οξέος. Επίσης εστέρες του θειικού οξέος εμφανίζονται σε μερικούς μονοσακχαρίτες των αλυσίδων. Και οι δύο δεσμοί διασπώνται από τα αντίστοιχα ένζυμα που παράγονται από συγκεκριμένα στελέχη βακτηρίων.

Πίνακας 1.5.2.α. Παραδείγματα βακτηριακής αποδόμησης των βλενοπρωτεϊνών με αναφορά στο είδος των βακτηρίων, τα ένζυμα που παράγουν και το λειτουργικό τους ρόλο τους στην αποδόμηση .

Λειτουργία	Ένζυμο	Βακτήριο	Αναφορά
Αποδόμηση πρωτεϊνικού	Πρωτεάσες	<i>Campylobacter</i> sp.	Slomiany et al., 1987

τμήματος			
Αποδόμηση της ολιγοσακχαριδικής αλυσίδας	Φουκοσιδάση	<i>Bacteroides sp.</i> (RS2 & RS13)	Stanley et al., 1986
	α-Γλυκοσιδάση	<i>Clostridium sp.</i> (RS42)	Robertson et al., 1982
	α-Γαλακτοσιδάση	<i>Bacteroides fragilis</i>	Hoskins et al., 1993
	Galβ3GalNAc-δάση	<i>Ruminococcus torques</i> IX-70 & VIII-239	Salyers et al., 1977
	Galβ3GlcNAc-δάση	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Ruminococcus gnavus</i>	Hoskins et al., 1992
Διάσπαση Ο-ακετυλ δεσμών των εστέρων	Σιαλιδάση	<i>Bacteroides fragilis</i>	Corfield et al., 1992 & 1993
	Ο-ακετυλ εστεράση του σιαλικού οξέος	<i>Clostridium septicum</i>	Mcfarlane et al., 2001
Διάσπαση Ο-θεικών εστέρων	Γλυκοσουλφατάση	<i>Bacteroides (Prevotella)</i>	RS2 Robertson et al., 1993 Wilkinson et al., 1988

## 1.6 Επίδραση της διατροφής στη φυσιολογία των βλεννοπρωτεϊνών

Μέχρι σήμερα, ένας περιορισμένος αριθμός ερευνών έχει αναφερθεί στην επίδραση της διατροφής των ορνιθίων κρεοπαραγωγής στη φυσιολογία του γλυκοκάλυκα και τη σύνθεση των βλεννοπρωτεϊνών του γαστρεντερικού σωλήνα. Η προσθήκη ενζύμων, προβιοτικών μικροοργανισμών, αντιβιοτικών, αιθερίων ελαίων, ολιγοσακχαριτών, αμινοξέων αλλά και η τεχνητή ασιτία, έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις αλλαγές σε ιστοχημικές παραμέτρους του εντερικού βλεννογόνου. Οι αναλυτικές τεχνικές έχουν επικεντρωθεί κυρίως στη διαφοροποίηση ουδέτερων, σιαλο- και σουλφο-βλεννοπρωτεϊνών, στην πυκνότητα και το μέγεθος των καλυκοειδών κυττάρων, στο πάχος του γλυκοκάλυκα, στη συγκέντρωση των ολικών βλεννοπρωτεϊνών και τη γονιδιακή έκφραση του MUC2 (Πίνακας 1.6.α.).

Πίνακας 1.6.α. Επίδραση της διατροφής σε φυσιολογικές παραμέτρους των εντερικών βλενοπρωτεϊνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Επίδραση διατροφής	Παράμετροι που αναλύθηκαν	Αποτελέσματα	Πηγή
2 επίπεδα πηκτινών εσπεριδοειδών	Αριθμός καλκοκοειδών κυττάρων	Αύξηση του αριθμού των καλκοκοειδών κυττάρων με την προσθήκη των 2 επιπέδων πηκτινών	Langhout et al., 1999
Σιτηρέσια βασισμένα στον αραβόσιτο, στο σιτάρι και στο σιτάρι με την προσθήκη ξυλανάσης	Σύσταση των μονοσακχαριτών των βλενοπρωτεϊνών με τη χρήση λεκτινών στη νήστιδα, το παχύ και το τυφλό έντερο, αριθμός καλκοκοειδών κυττάρων	i) Αύξηση των ουδέτερων και των σουλφο-βλεννινών με την προσθήκη ενζύμου ii) Αύξηση των ουδέτερων βλεννινών στο λεπτό και παχύ έντερο και μείωση στο τυφλό έντερο στο σιτηρέσιο με καλαμπόκι iii) Αλλαγή στη συγκέντρωση της ΝακΓлк και ΝαλΝευ με την προσθήκη ενζύμου	Sharma et al., 1997
Σιτηρέσια βασισμένα στον αραβόσιτο, στο σιτάρι και στο σιτάρι με την προσθήκη ξυλανάσης	Σύσταση των μονοσακχαριτών των βλενοπρωτεϊνών με τη χρήση λεκτινών στο λεπτό, το παχύ και το τυφλό έντερο	i) Αύξηση των ουδέτερων και των σουλφο-βλεννινών με την προσθήκη ενζύμου ii) Αύξηση των σιαλο-βλεννινών στο σιτηρέσιο με καλαμπόκι και στο σιτηρέσιο με σιτάρι και την προσθήκη ενζύμου	Fernandez et al., 2000

Ασιτία τις 2 πρώτες ημέρες μετά την εκκόλαψη	Αριθμός, μέγεθος και ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά καλυκοειδών κυττάρων	i) Αύξηση του αριθμού των καλυκοειδών κυττάρων την 2 <sup>η</sup> μέρα ασιτίας ii) Αύξηση του μεγέθους των καλυκοειδών κυττάρων iii) Αύξηση των όξινων βλεννοπρωτεϊνών	Uni et al., 2003
Ασιτία 72 ωρών	Πάχος γλυκοκάλυκα, συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών, μέγεθος καλυκοειδών κυττάρων, συγκέντρωση mRNA εντερικών βλεννοπρωτεϊνών	Η ασιτία προκάλεσε i) Μείωση του πάχους του γλυκοκάλυκα ii) Αύξηση της συγκέντρωσης των βλεννοπρωτεϊνών iii) Αύξηση του μεγέθους των καλυκοειδών κυττάρων iv) Αύξηση της συγκέντρωσης του mRNA των βλεννινών	Smirnov et al., 2004
1 επίπεδο ενός τετραστέλεχου ΠΣ και 1 επίπεδο ΑΑΠ (αβιλαμυκίνης)	Πάχος γλυκοκάλυκα, συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών, μέγεθος καλυκοειδών κυττάρων, συγκέντρωση mRNA εντερικών βλεννοπρωτεϊνών	i) Καμία επίδραση στο πάχος του γλυκοκάλυκα ii) Μείωση του μεγέθους των καλυκοειδών κυττάρων με την προσθήκη ΠΣ ή ΑΑΠ iii) Αύξηση της συγκέντρωσης των βλεννινών στη νήστιδα με την προσθήκη ΠΣ iv) Μείωση της συγκέντρωσης των βλεννινών στο δωδεκαδάκτυλο με την προσθήκη ΑΑΠ v) Αύξηση της συγκέντρωσης του mRNA των βλεννινών στη νήστιδα με την προσθήκη ΠΣ vi) Αύξηση της συγκέντρωσης του mRNA των	Smirnov et al., 2005

		βλεννινών στη νήστιδα και τον ειλέο με την προσθήκη ΑΑΠ	
5 επίπεδα αλεύρου σκόρδου	Αριθμός καλκοειδών κυττάρων στις λάχνες του λεπτού εντέρου	Μείωση του αριθμού των καλκοειδών κυττάρων στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και τον ειλέο με την προσθήκη >0,5% αλεύρου σκόρδου	Adibmoradi et al., 2006
Ασιτία για 12 και 24 ώρες	Συγκέντρωση ειλεακών βλενοπρωτεϊνών, αριθμός καλκοειδών κυττάρων	i) Μείωση της συγκέντρωσης των βλενοπρωτεϊνών ii) Καμία επίδραση στον αριθμό των καλκοειδών κυττάρων	Thompson & Applegate, 2006
In ovo προσθήκη υδατανθράκων την 17 <sup>η</sup> ημέρα εκκόλαψης	Συγκέντρωση mRNA εντερικών βλενοπρωτεϊνών, αριθμός και ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά καλκοειδών κυττάρων	i) Αύξηση της συγκέντρωσης mRNA την 19 <sup>η</sup> ημέρα και τη μέρα εκκόλαψης, αλλά όχι 3 μέρες μετά την εκκόλαψη ii) Καμία επίδραση στον αριθμό των καλκοειδών κυττάρων iii) Αύξηση των όξινων βλενοπρωτεϊνών την 19 <sup>η</sup> μέρα εκκόλαψης, αλλά όχι τη μέρα και 3 μέρες μετά την εκκόλαψη	Smirnov et al., 2006
2 επίπεδα L-θρεονίνης	Αριθμός καλκοειδών κυττάρων, συγκέντρωση ολικών βλενοπρωτεϊνών και NaκNeu οξέος,	i) Καμία επίδραση στον αριθμό των καλκοειδών κυττάρων ii) Αύξηση της συγκέντρωσης των βλενοπρωτεϊνών στο πείραμα 1, αλλά όχι στο πείραμα 2 iii) Αύξηση της συγκέντρωσης του	Horn et al., 2009

	γονιδιακή έκφραση MUC2	ΝακΝευ οξέος στο πείραμα 2, αλλά όχι στο πείραμα 1 iv) Καμία επίδραση στη γονιδιακή έκφραση του MUC2	
2 επίπεδα μαννανο-ολιγοσακχαριτών (MOS) και 3 επίπεδα L-θρεονίνης	Πάχος γλυκοκάλυκα, γονιδιακή έκφραση MUC2, ιστομορφομετρικά χαρακτηριστικά καλυκοειδών κυττάρων	i) Μείωση του πάχους του γλυκοκάλυκα στο χαμηλό επίπεδο θρεονίνης, ii) Αύξηση του πάχους με την προσθήκη MOS iii) Αλληλεπίδραση θρεονίνης και MOS στο πάχος στη νήστιδα iv) Αύξηση του γονιδίου MUC2 με την προσθήκη MOS, αλλά όχι θρεονίνης v) Αλληλεπίδραση θρεονίνης και MOS στον αριθμό σουλφο-βλενοπρωτεϊνών της νήστιδας	Chee et al., 2010a
2 επίπεδα μαννανο-ολιγοσακχαριτών (MOS) και 3 επίπεδα L-θρεονίνης	Συγκέντρωση βλενοπρωτεϊνών ειλεού	Αλληλεπίδραση θρεονίνης και MOS στη συγκέντρωση των ειλεακών βλεννινών	Chee et al., 2010b
1 επίπεδο MOS και 1 επίπεδο αντιβιοτικού (ψευδαργυρική βακτριακίνη)	Μέγεθος και ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά καλυκοειδών κυττάρων	i) Αύξηση μεγέθους καλυκοειδών κυττάρων με την προσθήκη MOS ή αντιβιοτικού ii) Αύξηση του αριθμού των σουλφο-βλενοπρωτεϊνών με την προσθήκη MOS ή αντιβιοτικού	Chee et al., 2010c

## 1.7 Ανακεφαλαίωση

Είναι αποδεδειγμένο ότι η αποτελεσματικότητα της πρώτης γραμμής άμυνας των ορνιθίων εναντίον εντερικών παθογόνων εξαρτάται από την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα του γλυκοκάλυκα. Η σύσταση του γλυκοκάλυκα είναι προϊόν μιας δυναμικής ισορροπίας μεταξύ του ρυθμού παραγωγής και έκκρισης των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών και του ρυθμού παραγωγής υδρολυτικών ενζύμων από την ενδογενή εντερική μικροχλωρίδα. Οι ενδογενείς βακτηριακοί πληθυσμοί, και κατ' επέκταση διατροφικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύστασή τους, πιθανώς να επηρεάζουν το σήμα για την έναρξη παραγωγής και έκκριση βλέννης, τη γλυκοζυλίωση ή τη γονιδιακή έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών και να ευθύνονται για τυχόν διαφοροποιήσεις στη σύσταση των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών σε επίπεδο μονοσακχαριτών και τη φυσιολογία των καλυκοειδών κυττάρων.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του επιπέδου προσθήκης ενός πολυστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος (ΠΣ) και ενός μίγματος αιθερίων ελαίων (ΜΑΕ) στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Ως παραγωγικά χαρακτηριστικά εξετάστηκαν το σωματικό βάρος και η αύξηση του σωματικού βάρους των πτηνών, ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής, η θνησιμότητα, ο Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας καθώς και οι συντελεστές ειλεακής και ολικής φαινομένης πεπτικότητας. Επίσης, σκοπός ήταν να εξεταστεί η επίδραση του επιπέδου προσθήκης ΠΣ ή ΜΑΕ σε παραμέτρους της οικολογίας του εντερικού συστήματος των πτηνών όπως η βιοχημική σύσταση των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών, η μορφολογία του εντέρου, το πάχος και η ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο, τον ειλεό και τα τυφλά έντερα ορνιθίων 14 και 42 ημερών. Επιπροσθέτως, στο πλαίσιο της παρούσης εργασίας μελετήθηκε η επίδραση του αντιβιοτικού αβιλαμυκίνη ως αυξητικού παράγοντα στις προαναφερθείσες παραμέτρους και η δυνατότητα αντικατάστασής του από τις υπό εξέταση πρόσθετες ύλες.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Χώρος Διεξαγωγής των Πειραμάτων**

Τα πειράματα της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν στις πειραματικές εγκαταστάσεις του τμήματος Επιστήμης της Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα:

- πείραμα Α, που περιελάμβανε την προσθήκη τριών διαφορετικών επιπέδων ενός πολυστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος (ΠΣ) και ενός επιπέδου αβιλαμυκίνης
- Πείραμα Β, που περιελάμβανε την προσθήκη τριών διαφορετικών επιπέδων ενός μίγματος αιθερίων ελαίων (ΜΑΕ) και ενός επιπέδου αβιλαμυκίνης στα σιτηρέσια των ορνιθίων

### **2.2 Πειραματικό Ζωικό Υλικό και Συνθήκες Εκτροφής**

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν, από τοπικό προμηθευτή (ΛΑΛΑΓΙΑΝΝΗΣ Α.Ε.), πεντακόσια είκοσι πέντε (525) αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής ανά πείραμα, υβριδίου Cobb 500 ηλικίας μίας ημέρας, εμβολιασμένα για ψευδοπανώλη, νόσο Marek και λοιμώδη βρογχίτιδα.

Τα πτηνά τοποθετήθηκαν εντός επιδαπέδιων ανεξάρτητων κλωβών εμβαδού 2 m<sup>2</sup> με αχυρένια στρωμένη. Κάθε κλωβός είχε ανεξάρτητη ταΐστρα, ποτίστρα και λάμπα θέρμανσης, ενώ γίνονταν καθημερινά εργασίες φροντίδας και καθαριότητας. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ήταν 27±1 °C κατά τη φάση έναρξης (1-14 ημέρες) και 25±1 °C για τις φάσεις ανάπτυξης (15-28 ημέρες) και πάχυνσης (29-42 ημέρες). Εκτός από την πρώτη ημέρα, το πρόγραμμα φωτισμού κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 23 ώρες φως και 1 ώρα σκότος.

### **2.3 Σιτηρέσια**

Πίνακας 2.1 Σύσταση βασικών σιτηρεσιών ανά παραγωγική φάση

Συστατικά (kg)	Εναρκτήριο	Ανάπτυξης	Τελικής
	1-14 ημέρες	15-28 ημέρες	πάχυνσης 29-42 ημέρες
Αραβόσιτος	538,4	583,2	631,1
Σογιάλευρο (44% ολική πρωτεΐνη)	283,7	261,2	251,1
Πρωτεΐνη Σόγιας (53% ολική πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	100,0	75,0	40,0
Φυτικό Λίπος <sup>2</sup>	35,8	42,6	40,6
Μαρμαρόσκονη	20,4	17,1	16,7
Φωσφορικό Μονοασβέστιο	9,2	9,7	11,1
Αλάτι	4,1	3,8	3,2
DL-Μεθειονίνη	2,5	2,0	1,7
L-Λυσίνη HCl	1,9	1,5	0,6
Πρόμιγμα βιταμινών <sup>3</sup>	2,0	2,0	2,0
Πρόμιγμα ιχνοστοιχείων <sup>4</sup>	2,0	2,0	2,0
Ανάλυση κατά υπολογισμούς (ανά kg σιτηρεσίου)			
ΦΜΕοο (Mj) <sup>5</sup>	12,5	12,7	12,7
Ξηρά Ουσία (g)	882,8	881,3	878,7
Ολικές Πρωτεΐνες (g)	221,5	201,0	180,6
Ολικές Λιπαρές Ουσίες (g)	62,2	69,6	68,5
Ολικές Ινώδεις Ουσίες (g)	35,6	33,7	31,9
Λυσίνη (g) <sup>6</sup>	13,5	11,9	9,9
Θειούχα Αμινοξέα (g) <sup>6</sup>	9,2	8,2	7,4
Θρεονίνη (g) <sup>6</sup>	8,4	7,6	6,9
Ασβέστιο (g)	10,6	9,3	9,3
Φώσφορος (g)	5,8	5,8	5,9

<sup>1</sup>Εμπορικό όνομα HP-200 (Hamlet Protein A/S, Δανία)

<sup>2</sup>Φυτικό υδρογονομένο φοινικέλαιο (Norel SA, Ισπανία)

<sup>3</sup>Το πρόμιγμα βιταμινών (Rovimix 11 BRO Basic, DSM Nutritional Products, Ελλάδα) ανά kg σιτηρεσίου περιείχε: 12.000 ΔΜ βιταμίνη Α, 4.000 ΔΜ βιταμίνη D3, 80 mg βιταμίνη Ε, 9 mg βιταμίνη Κ3, 3 mg θειαμίνη, 7 mg ριβοφλαβίνη, 6 mg πυριδοξίνη, 25 μg κυανοκοβαλαμίνη, 50 mg νικοτινικό οξύ, 15 mg παντοθενικό οξύ, 1,5 mg φυλλικό οξύ και 0,15 mg βιοτίνη

<sup>4</sup>Το πρόμιγμα ιχνοστοιχείων (Rovimix BRO M, DSM Nutritional Products, Ελλάδα) ανά kg σιτηρεσίου περιείχε: 400 mg χλωριούχου χολίνης, 250 μg κοβάλτιο, 1,5 mg ιώδιο, 300 μg σελήνιο, 50 mg σίδηρο, 130 mg μαγγάνιο, 20 mg χαλκό και 100 mg ψευδάργυρο

<sup>5</sup>Φαινομένη Μεταβολιστέα Ενέργεια Πτηνών διορθωμένη για το άζωτο του ουρικού οξέος

<sup>6</sup>Οι υπολογισμένες αναλογίες των αμινοξέων για τις φάσεις έναρξης, ανάπτυξης και πάχυνσης ήταν: θειούχα αμινοξέα:λυσίνη 0,69:1, 0,71:1 & 0,77:1 και θρεονίνη:λυσίνη 0,62:1, 0,62:1 & 0,70:1 αντίστοιχα

Τα σιτηρέσια των ορνιθίων (βασικό σιτηρέσιο, ΒΣ) ήταν βασισμένα στον αραβόσιτο, το σογιάλευρο (44% ολική πρωτεΐνη) και τη συμπυκνωμένη πρωτεΐνη σόγιας (53% ολική πρωτεΐνη). Κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) σιτηρέσια ΒΣ: εναρκτήριο (για ορνίθια ηλικίας 1-14

ημερών), ανάπτυξης (για ορνίθια ηλικίας 15-28 ημερών) και τελικής πάχυνσης (για ορνίθια ηλικίας 29-42 ημερών). Τα ΒΣ παρασκευάστηκαν από την εταιρία ΦΑΡΜΑ ΕΦΥΡΑ Α.Β.Ε.Ε. και αναφέρονται αναλυτικά στον πίνακα 2.1. Η ανάμιξη των πρόσθετων ουσιών (προβιοτικού σκευάσματος, μίγματος αιθερίων ελαίων και αντιβιοτικών) πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Γ.Π.Α. σε εβδομαδιαία βάση. Τα σιτηρέσια παρασκευάστηκαν σε αλευρώδη μορφή, χωρίς την προσθήκη κοκκιδιοστατικού.

## 2.4 Πρόσθετες ύλες διατροφής

Για το πείραμα Α, το ΠΣ που χρησιμοποιήθηκε (PoultryStar ME, Biomin GmbH, Αυστρία) περιλάμβανε πέντε διαφορετικά στελέχη βακτηρίων που απομονώθηκαν από τον πρόλοβο (*Lactobacillus reuteri* DSM 16350), τη νήστιδα (*Enterococcus faecium* DSM 16211), τον ειλεό (*Bifidobacterium animalis* DSM 16284) και τα τυφλά έντερα (*Pediococcus acidilactisi* DSM 16210 & *Lactobacillus salivarius* DSM 16351) υγιών ενήλικων ορνιθίων. Το προϊόν σχεδιάστηκε ειδικά για τις ανάγκες του πειράματος έτσι ώστε η προσθήκη 1 g ΠΣ ανά kg ΒΣ να δίνει την επιθυμητή συγκέντρωση (CFU/ kg τελικής τροφής) του προβιοτικού μικροοργανισμού στο τελικό σιτηρέσιο.

Για το πείραμα Β, το ΜΑΕ (Biomin P.E.P., Biomin GmbH, Αυστρία) που χρησιμοποιήθηκε αποτελείτο από αιθέρια έλαια ρίγανης, γλυκάνισου και εσπεριδοειδών με συγκέντρωση ενεργών συστατικών 115 gr / kg ΜΑΕ, σε φορέα φρουκτο-ολιγοσακχαριτών. Το βασικό ενεργό συστατικό ήταν η καρβακρόλη με ποσοστό 89% επί του συνόλου ενώ τα υπόλοιπα ενεργά συστατικά ήταν η ανηθόλη και το λεμονένιο.

Και στα δύο πειράματα, το αντιβιοτικό αβιλαμυκίνη (MAXUS 100, Elanco Animal Health, Ελλάδα), αποτελεσματικό κυρίως για τα Gram+ βακτήρια, χρησιμοποιήθηκε ως αυξητικός παράγοντας.

## 2.5 Πειραματικές επεμβάσεις

Ο πειραματικός σχεδιασμός και για τα δύο πειράματα, περιλάμβανε 5 επεμβάσεις με τρεις επαναλήψεις των 35 ορνιθίων έκαστη.

Για το **πείραμα Α**, οι επεμβάσεις περιγράφονται αναλυτικά ως: βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς επιπλέον προσθήκη (μάρτυρας, C) πρόσθετων διατροφής, ΒΣ με προσθήκη  $10^8$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P1), ΒΣ με προσθήκη  $10^9$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P2), ΒΣ με προσθήκη  $10^{10}$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση A).

Για το **πείραμα Β**, οι ακόλουθες επεμβάσεις χρησιμοποιήθηκαν: ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη (μάρτυρας, C) πρόσθετων διατροφής, ΒΣ με προσθήκη 80 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E1), ΒΣ με προσθήκη 125 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E2), ΒΣ με προσθήκη 250 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 g αβιλαμυκίνης / κιλό τροφής (επέμβαση A).

Προς υπενθύμιση, οι πειραματικές επεμβάσεις θα αναφέρονται και στην αρχή της σύντομης περιγραφής του εκάστοτε άρθρου.

## **2.6 Προσδιορισμός παραγωγικών χαρακτηριστικών**

Όσον αφορά τα παραγωγικά χαρακτηριστικά εξετάστηκαν το σωματικό βάρος (ΣΒ), η κατανάλωση τροφής (ΚΤ), η αύξηση του σωματικού βάρους (ΑΣΒ), ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (ΣΕΤ) οριζόμενος ως ΚΤ:ΑΣΒ (για το πείραμα Α), η μετατρεψιμότητα της τροφής οριζόμενη ως ΑΣΒ:ΚΤ (για το πείραμα Β) για κάθε παραγωγική φάση και για το σύνολο του πειράματος. Η ΚΤ για κάθε παραγωγική φάση υπολογίστηκε, διαιρώντας τη συνολική κατανάλωση τροφής του κλωβού (διορθώνοντας για την ποσότητα τροφής που καταναλώθηκε από ορνίθια που απεβίωσαν κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης) με τον αριθμό των ζωντανών πτηνών κατά το τέλος της αντίστοιχης περιόδου.

Επιπροσθέτως, εξετάστηκαν η θνησιμότητα και ο Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας (ΕΔΠ, European Production Efficiency Factor) κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος. Ο ΕΔΠ υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση των Awad et al., (2008) ως:  $\Sigma \text{Β (kg)} \times \text{Βιωσιμότητα (\%)} \times 100 / \text{Ηλικία (ημέρες)} \times \Sigma \text{ΕΤ}$  και είναι καθαρός αριθμός. Τιμές ΕΔΠ υψηλότερες από 300 χαρακτηρίζουν μονάδες υψηλής παραγωγικότητας.

## **2.7 Προσδιορισμός ειλεακής και ολικής πεπτικότητας**

Οι συντελεστές της ειλεακής και ολικής φαινομένης πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών προσδιορίστηκαν με την προσθήκη οξειδίου του χρωμίου ως αναλυτικού δείκτη (Sales and Janssens, 2003). Πιο συγκεκριμένα, στα σιτηρέσια κάθε πειραματικής επέμβασης προστέθηκαν και αναμείχθηκαν προσεχτικά 500 mg Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ kg τροφής. Κατά την 21<sup>η</sup> μέρα του πειράματος, πέντε (5) πουλιά ανά κλωβό (επανάληψη) επιλέχθηκαν τυχαία και τοποθετήθηκαν σε ειδικά σχεδιασμένους κλωβούς πεπτικότητας (15 ορνίθια ανά επέμβαση με 3 επαναλήψεις των 5 πτηνών έκαστη) με συρμάτινο πάτωμα και δίσκους συλλογής περιττωμάτων. Κάθε κλωβός πεπτικότητας είχε μια ταΐστρα και δύο ποτίστρες. Το πείραμα πεπτικότητας είχε μια προπειραματική περίοδο 4 ημερών και μια κύρια πειραματική περίοδο συλλογής περιττωμάτων 3 ημερών. Κατά την πειραματική περίοδο, γινόταν συλλογή περιττωμάτων 4 φορές τη μέρα (ανά 6 ώρες) και τα δείγματα ζυγίζονταν και τοποθετούνταν σε σφραγισμένες σακούλες σε θερμοκρασία -20 °C. Η τροφή που είχε πέσει στους δίσκους συλλογής απομακρυνόταν με προσοχή και ζυγιζόταν. Επίσης, διαχωρίζονταν και απομακρύνονταν τα πούπουλα από τα περιττώματα. Στο τέλος του πειράματος πεπτικότητας, όλα τα ορνίθια θυσιάστηκαν και το γαστρεντερικό τμήμα απομακρύνθηκε προσεκτικά από το σφάγιο. Ο ειλεός διαχωρίστηκε και το περιεχόμενό του αποθηκεύτηκε άμεσα στους -20 °C, μέχρι να αναλυθεί.

Για τον προσδιορισμό των συντελεστών ολικής πεπτικότητας, τα δείγματα των περιττωμάτων των 5 ορνιθίων του ίδιου κελιού συγκεντρώθηκαν, ομαδοποιήθηκαν και αναφέρονται ως μια επανάληψη. Παρομοίως, τα περιεχόμενα των ειλεών των πτηνών κάθε κλωβού πεπτικότητας συγκεντρώθηκαν, ομαδοποιήθηκαν και αναφέρονται ως μια επανάληψη.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων της τροφής και των περιττωμάτων για ξηρά ουσία (ΞΟ), τέφρα, ολικές λιπαρές ουσίες (ΛΟ), ολικές ινώδεις ουσίες (ΙΟ) και ολικές αζωτούχες ουσίες (ΑΟ) σύμφωνα με τις αναλυτικές τεχνικές του AOAC (1994), ενώ υπολογίστηκε η οργανική ουσία (ΟΟ) και οι ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες (ΕΝΕΟ) των δειγμάτων. Για τον προσδιορισμό των ΙΟ, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά σακίδια και χρησιμοποιήθηκε αναλυτής ινωδών ουσιών ANKOM 220 (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA). Για τον προσδιορισμό των ΑΟ (N × 6,25), μετρήθηκε το άζωτο των δειγμάτων με τη μέθοδο Kjeldhal χρησιμοποιώντας αναλυτή Kjeltac 2300 (Foss Tecator AB, Hoganas, Sweden).

Για τα ειλεακά περιεχόμενα προσδιορίστηκαν η ΞΟ, οι ΑΟ και οι ΛΟ, όπως προηγουμένως. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν και ο μέσος όρος των 2 μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική επεξεργασία.

Για τον προσδιορισμό του συντελεστή ολικής ΦΠαο, μετρήθηκε το περιεχόμενο του αζώτου που βρίσκεται στο ουρικό οξύ των περιττωμάτων των ορνιθίων σύμφωνα με τη μέθοδο του Marquart (1983) και αφαιρέθηκε από το συνολικό άζωτο των περιττωμάτων.

Η ολική ενέργεια των τροφών και των περιττωμάτων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια αδιαβατικού θερμιδόμετρου (Parr Instrument Company, IL, USA), χρησιμοποιώντας βενζοϊκό οξύ ως πρότυπο αναφοράς.

Η συγκέντρωση του  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  στην τροφή και τα περιττώματα ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης (Williams et al., 1962), ύστερα από αποτέφρωση και χημική πέψη των δειγμάτων με διαλύματα φωσφορικού οξέος/θειϊκού μαγγανίου και βρωμικού καλίου.

Οι συντελεστές φαινομένης πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών υπολογίστηκαν αναφορικά με το δείκτη του οξειδίου του χρωμίου. Η ΦΜΕοο των σιτηρεσίων υπολογίστηκε αναφορικά με το  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , διορθωμένη για την ενέργεια του ουρικού οξέος κατά 34,39 kJ/ g απορροφημένου αζώτου (Hill και Anderson, 1958).

## **2.8 Προσδιορισμός της βιοχημικής σύστασης των βλεννοπρωτεϊνών του εντέρου**

Ως βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών θα αναφέρεται η μοριακή αναλογία των 6 μονοσακχαριτών (N-ακευλ-γαλακτοζαμίνη, N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη, γαλακτόζη, μαννόζη, φουκόζη, N-ακετυλ-νευραμινικό οξύ) στις υδατανθρακικές πλευρικές αλυσίδες των μορίων και θα εκφράζεται ως εκατοστιαίο ποσοστό επί του συνόλου των μονοσακχαριτών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε τρία (3) στάδια: α) απομόνωση της βλέννης από το εντερικό επιθήλιο, β) απομόνωση του υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεϊνών από τη βλέννη με τη βοήθεια χρωματογραφίας διαχωρισμού μάζας (Size Exclusion Chromatography) και γ) ποσοτικός προσδιορισμός των

μονοσακχαριτών με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Για την εξέταση της μοριακής αναλογίας των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών, έξι ορνίθια ανά επέμβαση θυσιάστηκαν, ύστερα από τυχαία επιλογή, στην ηλικία των 14 και 42 ημερών. Το γαστρεντερικό τμήμα απομακρύνθηκε προσεκτικά και τρία τμήματα εντέρου διαχωρίστηκαν (δωδεκαδάκτυλος, ειλεός και τυφλό έντερο), ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο άμεσα και αποθηκεύθηκαν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να αναλυθούν. Ως δωδεκαδάκτυλος ορίστηκε το τμήμα που ξεκινά από τον πυλωρό έως το σημείο εισόδου των παγκρεατικών πόρων. Ως ειλεός ορίστηκε το τμήμα από το εγκόλπωμα του Meckel έως την ειλεοτυφλική βαλβίδα. Ως τυφλό έντερο ορίστηκαν και τα δυο τυφλά αμυγδαλωτού σχήματος.

Δυστυχώς, παρά την επαναλαμβανόμενη προσπάθεια, η ποσότητα της βλέννης των τυφλών εντέρων των ορνιθίων 14 ημερών ήταν πολύ μικρή και η συλλογή της αδύνατη. Για αυτό το λόγο, η μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννινών δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί σε ατομικό επίπεδο και δεν αναφέρεται παρακάτω.

### **2.8.1 Απομόνωση βλέννης από το εντερικό επιθήλιο**

Κάθε τμήμα του εντέρου αποψύχθηκε σε πάγο, τοποθετήθηκε πάνω σε παγωμένη επιφάνεια και ανοίχτηκε κατά μήκος, με την ανοιχτή επιφάνεια του βλεννογόνου προς τα πάνω. Το εντερικό περιεχόμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά, χωρίς να επηρεάσει το γλυκοκάλυκα. Ακολούθησε εις τριπλούν έκπλυση των ιστών σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, 0,1 M pH 7), που περιείχε φθοριούχο φαινυλ-μεθυλ-σουλφονύλιο, ιωδοακεταμίδιο και αιθυλεν-διαμιν-τετρα-οξικό οξύ (EDTA) για την αναστολή πρωτεολυτικής δραστηριότητας (Ouwehand et al., 1999). Οι ιστοί στέγνωσαν σε διηθητικό χαρτί και τοποθετήθηκαν σε παγωμένη γυάλινη επιφάνεια.

Με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας, η βλέννη απομακρύνθηκε απαλά από το βλεννογόνο, τοποθετήθηκε σε ειδικά σκεύη τύπου bijoux και ζυγίστηκε. Παγωμένο διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 5 mM και pH 7 προστέθηκε στα bijoux, με τελική συγκέντρωση 150 mg βλέννης/ ml EDTA (Libao-Mercado και De Lange, 2007). Τα



ομογενοποιημένα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4 °C για 30 λεπτά στις 10.000 × g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο, που περιείχε τις υδατοδιαλυτές βλεννοπρωτεΐνες.

### **2.8.2 Απομόνωση των βλεννοπρωτεϊνών από τη βλέννη**

Ο διαχωρισμός των βλεννοπρωτεϊνών από τα υπόλοιπα συστατικά της βλέννης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της χρωματογραφίας διαχωρισμού μάζας (size exclusion chromatography), σύμφωνα με τους Libao-Mercado και De Lange (2007), με κάποιες τροποποιήσεις (Εικόνα 5). Πιο συγκεκριμένα, μια στήλη XK-16 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Sweden) συμπληρώθηκε με 15 ml Σεφαρόζης CL-4B και διάλυμα 0,2M NaCl χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα έκλουσης με την ταχύτητα ροής να είναι 0,63 ml διαλύματος/ λεπτό. Πριν την ανάλυση κάθε δείγματος, η ρητίνη ερχόταν σε ισορροπία με διπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης. Πεντακόσια μl υπερκείμενου δείγματος χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση και οι υψηλού μοριακού βάρους βλεννοπρωτεΐνες ( $MB > 2 \times 10^6$  Da) συλλέχθηκαν σε κλάσματα του 1 ml, ύστερα από την έκλουσή τους στον κενό (void) χώρο της στήλης. Η παρακολούθηση της έκλουσης του κάθε κλάσματος γίνονταν επιτόπου (on line) με τη βοήθεια ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (280 nm) και ανιχνευτή διάθλασης (refractive index detector). Στη συνέχεια όλα τα κλάσματα που αντιπροσώπευαν την κορυφή του χρωματογραφήματος και της γραφικής παράστασης των μετρήσεων απορρόφησης ενώνονταν, καταψύχονταν και εν συνεχεία λυοφιλοποιούνταν. Οι λυοφιλοποιημένες βλεννοπρωτεΐνες διαλύθηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση 100 mg/ ml και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

### **2.8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνης, γαλακτόζης, μαννόζης και φουκόζης**

Για τον προσδιορισμό των μονοσακχαριτών ΝακΓλκ, ΝακΓαλ, Γαλ, Μαν και Φουκ, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ξυλόζης 1mM (λόγω απουσίας της ξυλόζης από το μόριο των βλεννοπρωτεϊνών) σαν εσωτερικό πρότυπο αναφοράς.

Εικόνα 4. Χρωματογραφία διαχωρισμού μάζας (Size exclusion Chromatography)



1. Συλλογή κλασμάτων
2. Αντλία
3. Εισαγωγή δείγματος (loop)
4. Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης
5. Στήλη XK-10
6. Sepharose CL-4B
7. Αναλυτής διάθλασης
8. Χρωματογραφήματα ανάλυσης

Το διάλυμα ξυλόζης προστέθηκε στα διαλύματα των λυοφιλιωποιημένων δειγμάτων βλεννινών και στα διαλύματα των πρότυπων αναφοράς μονοσακχαριτών, με αναλογία 1:9 v/v.

### **2.8.3.1 Υδρόλυση εντερικών βλεννοπρωτεϊνών και πρότυπων αναφοράς**

Ποσότητα 20 μl από τα προαναφερθέντα δείγματα βλεννινών και πρότυπων αναφοράς τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια και προστέθηκαν 75 μl τριφθορο-οξικό οξύ συγκέντρωσης 20%. Τα φιαλίδια σφραγίστηκαν με αλουμινένια καπάκια και τοποθετήθηκαν για επώαση σε thermo block (Falc Instruments, Treviglio, Italy) θερμοκρασίας 100 °C για 3 ώρες. Μετά το τέλος της υδρόλυσης, τα φιαλίδια αποσφραγίστηκαν και επώαστηκαν υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι ξήρανσης (Anumula, 1994).

### **2.8.3.2 Παραγωγοποίηση των μονοσακχαριτών με 2-αμινο-βενζοϊκό οξύ**

Για την παραγωγοποίηση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών και των πρότυπων αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο που βασίστηκε στο 2-αμινο-βενζοϊκό οξύ (ABO, ανθρανιλικό οξύ), με σκοπό την αναγωγική αμίνωση των υδατανθράκων. Πιο αναλυτικά, 30 mg ABO και 20 mg κυανο-βορο-υδρίδιο του νατρίου διαλύθηκαν σε 1 ml οξικού/ βορικού διαλύματος (2,4% οξικού νατρίου και 2% βορικού οξέος σε μεθανόλη). Πενήντα μl του αντιδραστηρίου ABO προστέθηκαν στα προϊόντα της υδρόλυσης των βλεννινών και των πρότυπων αναφοράς, αφού πρώτα είχαν διαλυθεί σε 20 μl φρεσκο-προετοιμασμένου διαλύματος οξικού νατρίου 0,6%. Τα φιαλίδια σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν (thermo block) για επώαση σε θερμοκρασία 80 °C για 1 ώρα. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στα προϊόντα της παραγωγοποίησης προστέθηκαν 930 μl διαλύτη A (κεφάλαιο 2.8.3.3) και ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μονοσακχαριτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Anumula, 1994).

### 2.8.3.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για ΝακΓλκ, ΝακΓαλ, Γαλ, Μαν και Φουκ

Τα προϊόντα παραγωγοποίησης της ΝακΓλκ, ΝακΓαλ, Γαλ, Μαν και Φουκ προσδιορίστηκαν ποσοτικά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, σύμφωνα με τη μέθοδο του Anumula (1994), ύστερα από μερικές τροποποιήσεις. Πιο αναλυτικά, το σύστημα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε (Hewlett Packard 1100 series) ήταν εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή φθορισμού (HP 1046A) και μια C-18 στήλη αντίστροφης φάσης (Hypersil ODS, 5  $\mu\text{m}$ , 200  $\times$  2,1 mm), με την ανάλυση να διαρκεί 35 λεπτά. Για το διαχωρισμό των μονοσακχαριτών, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα: 1) το διάλυμα Α που περιείχε 0,25% 1-βουτυλαμίνη, 0,5% ορθο-φωσφορικό οξύ και 1% τετρα-υδρο-φουράνη σε νερό HPLC και 2) το διάλυμα Β που περιλάμβανε το διάλυμα Α και ακετυλο-νιτρίλιο σε αναλογία 1:1. Η διαχωρισμός των μονοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης της κινητής φάσης. Σύμφωνα με το πίνακα της έκλουσης (Πίνακας 2.2), το διάλυμα Β αυξήθηκε γραμμικά στην κινητή φάση από το 8% στο 12% στα πρώτα 25 λεπτά της ανάλυσης. Ακολούθως η στήλη ξεπλύθηκε με 100% διάλυμα Β για 5 λεπτά και εξισορρόπησε για τα επόμενα 5 λεπτά με την αρχική κινητή φάση, για την εξασφάλιση της επαναληπτικότητας της μεθόδου.

Πίνακας 2.2 Πίνακας έκλουσης διαλυμάτων κινητής φάσης HPLC για ΝακΓλκ, ΝακΓαλ, Γαλ, Μαν και Φουκ

Χρόνος (λεπτά)	Διάλυμα Α (%)	Διάλυμα Β (%)
0	92	8
25	88	12
30	0	100
35	92	8

Η θερμοκρασία του συστήματος ήταν καθορισμένη στους 25 °C και η ροή της κινητής φάσης στα 0,5 ml/ λεπτό. Η ανάλυση των δειγμάτων και των πρότυπων αναφοράς έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Anumula (1994) μέσω υπολογιστικού

συστήματος χρωματογραφίας (Agilent Chemstation). Ο ποσοτικός προσδιορισμός του κάθε μονοσακχαρίτη πραγματοποιήθηκε κατόπιν βαθμονόμησης του συστήματος με τα πρότυπα αναφοράς. Όλα τα δείγματα των βλεννοπρωτεϊνών και τα πρότυπα αναφοράς των μονοσακχαριτών αναλύθηκαν εις τριπλούν. Χρωματογραφήματα μονοσακχαριτών εντερικών βλεννοπρωτεϊνών και πρότυπων αναφοράς παρουσιάζονται στο παράρτημα 1.

#### **2.8.4 Ποσοτικός προσδιορισμός N-ακετυλ-νευραμινικού (σιαλικού) οξέος**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ΝακΝευ χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σύμφωνα με τη μέθοδο του Anumula (1995), με τις τροποποιήσεις που αναφέρονται ακολούθως. Για την εξασφάλιση της ποιότητας της μεθόδου, γνωστή συγκέντρωση ΝακΝευ ακολούθησε όλα τα στάδια της ανάλυσης και χρησιμοποιήθηκε σαν εξωτερικό πρότυπο αναφοράς.

##### **2.8.4.1 Ήπια υδρόλυση εντερικών βλεννοπρωτεϊνών και πρότυπων αναφοράς**

Τα λυοφιλιωποιημένα δείγματα των βλεννινών και τα πρότυπα αναφοράς ΝακΝευ (50  $\mu$ l) τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και αναμείχθηκαν με 50  $\mu$ l διαλύματος όξινου θειικού νατρίου συγκέντρωσης 0,25M. Τα φιαλίδια σφραγίστηκαν και επώαστηκαν στους 80 °C για 20 λεπτά (Anumula, 1995).

##### **2.8.4.2 Παραγωγοποίηση του ΝακΝευ με ορθο-φαινυλ-διαμίνη**

Για το αντιδραστήριο της ορθο-φαινυλ-διαμίνης (ΟΦΔ), 20 mg ΟΦΔ·2HCl προστέθηκαν σε 1 ml διαλύματος όξινου θειικού νατρίου (0,25 M). Στα προϊόντα της υδρόλυσης προστέθηκαν 100  $\mu$ l φρεσκο-προετοιμασμένου αντιδραστηρίου ΟΦΔ και τα φιαλίδια σφραγίστηκαν και επώαστηκαν στους 80 °C για 40 λεπτά. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στα προϊόντα της παραγωγοποίησης συμπληρώθηκε ποσότητα διαλύτη Γ (κεφάλαιο 2.8.4.3) μέχρι τελικού όγκου 1 ml και ακολούθησε ο

ποσοτικός προσδιορισμός του ΝακΝευ με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Anumula, 1995).

#### 2.8.4.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για ΝακΝευ

Τα προϊόντα παραγωγοποίησης ΟΦΔ/ΝακΝευ προσδιορίστηκαν ποσοτικά σύμφωνα με τη μέθοδο του Anumula (1995), χρησιμοποιώντας το σύστημα χρωματογραφίας που περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.8.3.3. Τα διαλύματα της κινητής φάσης της ανάλυσης ήταν: 1) το διάλυμα Γ που περιείχε 0,15% 1-βουτυλαμίνη, 0,5% ορθο-φωσφορικό οξύ και 1% τετρα-υδρο-φουράνη σε νερό HPLC και 2) το διάλυμα Δ που περιλάμβανε το διάλυμα Γ και ακετυλο-νιτρίλιο σε αναλογία 1:1. Ο προσδιορισμός του ΝακΝευ πραγματοποιήθηκε ύστερα από ισοκρατική (σταθερή) έκλυση κινητής φάσης με 92% διαλύματος Γ και 8% διαλύματος Δ για 12 λεπτά. Ακολούθως, η στήλη ξεπλύθηκε με 100% διάλυμα Δ για 5 λεπτά και εξισορρόπησε για τα επόμενα 5 λεπτά με την αρχική κινητή φάση, για την εξασφάλιση της επαναληπτικότητας της μεθόδου.

Πίνακας 2.3 Πίνακας έκλυσης διαλυμάτων κινητής φάσης HPLC για ΝακΝευ

Χρόνος (λεπτά)	Διάλυμα Γ (%)	Διάλυμα Δ (%)
0	92	8
12	92	8
17	0	100
22	92	8

Η ανάλυση διήρκεσε 22 λεπτά και το πρόγραμμα έκλυσης αναφέρεται αναλυτικά στον πίνακα 2.3. Η θερμοκρασία του συστήματος ήταν καθορισμένη στους 25 °C και η ροή της κινητής φάσης στα 0,5 ml/ λεπτό. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ΝακΝευ πραγματοποιήθηκε κατόπιν κατάλληλης βαθμονόμησης με το πρότυπο αναφοράς, με τη βοήθεια του προαναφερθέντος υπολογιστικού συστήματος χρωματογραφίας. Όλα τα δείγματα των βλεννοπρωτεϊνών και τα πρότυπα αναφοράς του ΝακΝευ αναλύθηκαν εις τριπλούν (Anumula, 1995). Χρωματο-γραφήματα

προσδιορισμού του NakNeu των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών και των πρότυπων αναφοράς παρουσιάζονται στο παράρτημα 2.

## **2.9 Ιστολογία εντέρου**

Για τις ιστολογικές παρατηρήσεις, 3 ορνίθια ανά πειραματική επέμβαση θυσιάστηκαν, ύστερα από τυχαία επιλογή, και εξετάστηκαν 3 εντερικά τμήματα (δωδεκαδάκτυλος, ειλεός και τυφλό έντερο όπως έχουν οριστεί στο κεφάλαιο 2.8). Ένα δείγμα ιστού, εμβαδού 1 cm<sup>2</sup>, απομακρύνθηκε από το μέσο κάθε εντερικού τμήματος και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% (79382, Fluka, Buchs, Switzerland) σε PBS 0,1 M και pH 7,4, σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Ακολούθησε εις τριπλούν πλύση των ιστών σε διάλυμα PBS για 30 λεπτά κάθε φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα PBS που περιείχε 7% σακχαρόζη και 0,1% αζίδιο του νατρίου και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C, μέχρι τη διενέργεια των τομών. Τα δείγματα των ιστών επικαλύφθηκαν με μέσο κρυοπροστασίας (Tissue-Tek, Germany) και εμβαπτίστηκαν σε κατεψυγμένο ισοπεντάνιο (σε θερμοκρασία υγρού αζώτου), για την ακέραη διατήρηση των ιστών κατά τις σειριακές τομές. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 5 εγκάρσιες τομές πάχους 10 μm σε κρυοτόμο (Leica CM1500), τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλυμμένες με πολυμερισμένη L-λυσίνη και αποθηκεύτηκαν στους -30 °C, μέχρι να αναλυθούν. Οι ιστολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (Olympus BX 50) σε οπτική μεγέθυνση 20X, με τη χρήση επιτραπέζιου φακού. Η φωτογράφιση των τομών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού για ανάλυση εικόνας (Image-Pro Plus Version 3.1, Media Cybernetics, USA)

### **2.9.1 Επικάλυψη αντικειμενοφόρων πλακών με πολυμερισμένη L-λυσίνη**

Πριν την χρησιμοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών για την τοποθέτηση των κρυοτομών, κρίθηκε απαραίτητη η επικάλυψή τους με πολυμερισμένη L-λυσίνη, με σκοπό την καλύτερη προσκόλληση των τομών και τη μείωση των απωλειών τους κατα

τις τεχνικές της ιστοχημείας. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα όξινης αλκοόλης (70% αιθανόλη και 1% υδροχλώριο 1 N) για 90 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό για 90 λεπτά, τοποθετήθηκαν σε αποσταγμένο νερό για 5 λεπτά και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα πολυμερισμένης L-λυσίνης (10% σε απεσταγμένο νερό) για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθως, οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C για 24 ώρες προς ξήρανση.

## **2.9.2 Χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης**

Για τον προσδιορισμό των μορφολογικών χαρακτηριστικών των τμημάτων του εντέρου, χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο χρώσης των κυττάρων με ηωσίνη και αιματοξυλίνη (Harris, 1900). Η αιματοξυλίνη Harris βάφει τους πυρήνες των κυττάρων με μπλε χρώμα, ενώ η ηωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα με ρόδινο χρώμα. Μία αντικειμενοφόρος πλάκα ανά ορνίθιο εμβαπτίστηκε σε διάλυμα PBS 0,1 M για 3 λεπτά και κατόπιν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για δύο λεπτά. Ακολούθησε ξέπλυμα σε νερό βρύσης και εμβάπτιση σε διάλυμα ηωσίνης (1 g νατριούχου ηωσίνης σε 100 ml αποσταγμένου νερού) για άλλα δύο λεπτά. Ύστερα από ξέπλυμα σε νερό βρύσης, οι τομές αφυδατώθηκαν με διαδοχική εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε διαλύματα αιθανόλης αυξημένης συγκέντρωσης (2 × 50%, 70%, 90%, 2 × 100%) και διάλυμα ξυλενίου (2X). Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες παρέμειναν σε απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου για την εξάτμιση του ξυλενίου και οι τομές επικαλύφθηκαν με διάλυμα DEPEX (18243, Serva, Heidelberg, Germany) και καλυπτρίδες.

### **2.9.2.1 Μέτρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών του εντερικού επιθηλίου**

Για τη μελέτη της επίδρασης των πρόσθετων διατροφής στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντερικού βλεννογόνου, εξετάστηκαν τρεις τομές από το δωδεκαδάκτυλο, τον ειλέο και το τυφλό έντερο τριών ορνιθίων και μετρήθηκαν, το ύψος των λαχνών (ΥΛ), το βάθος των κρυπτών (BK) και ο λόγος ΥΛ:ΒK τριών λαχνών και των παρακείμενων κρυπτών (σύνολο 27 μετρήσεις ανά εντερικό τμήμα ανά



επέμβαση). Ως ΥΛ ορίστηκε το τμήμα από την κορυφή της λάχνης έως το σημείο που συναντάται η κρύπτη. Ως ΒΚ ορίστηκε το βάθος του κόλπου μεταξύ δύο λαχών. Οι παράμετροι ΥΛ και ΒΚ εκφράστηκαν σε  $\mu\text{m}$ , ενώ ο λόγος ΥΛ:ΒΚ είναι καθαρός αριθμός. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κάτω από αντικειμενικά κριτήρια από τον ίδιο παρατηρητή.

### **2.9.3 Χρώση Alcian Blue-PAS pH 2.5**

Για τον προσδιορισμό του πάχους και της έντασης χρώσης του γλυκοκάλυκα στις εντερικές λάχνες, χρησιμοποιήθηκε εμπορικό πρωτόκολλο χρώσης με τις χρωστικές Alcian Blue-PAS (pH 2,5, Clinicare, Ελλάδα). Η εμπορική συσκευασία περιλάμβανε το αντιδραστήριο Periodic Acid-Schiff (PAS) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό (ερυθρό χρώμα) των ουδέτερων βλεννοπρωτεϊνών και το αντιδραστήριο Alcian Blue 1% (pH 2,5) για τον προσδιορισμό (μπλε χρώμα) των όξινων (σιαλο-) βλεννοπρωτεϊνών. Ένα μωβ χρώμα αποτελεί ένδειξη ενός μίγματος ουδέτερων και όξινων βλεννινών, που αποτέλεσε το σκοπό της παρούσης ανάλυσης.

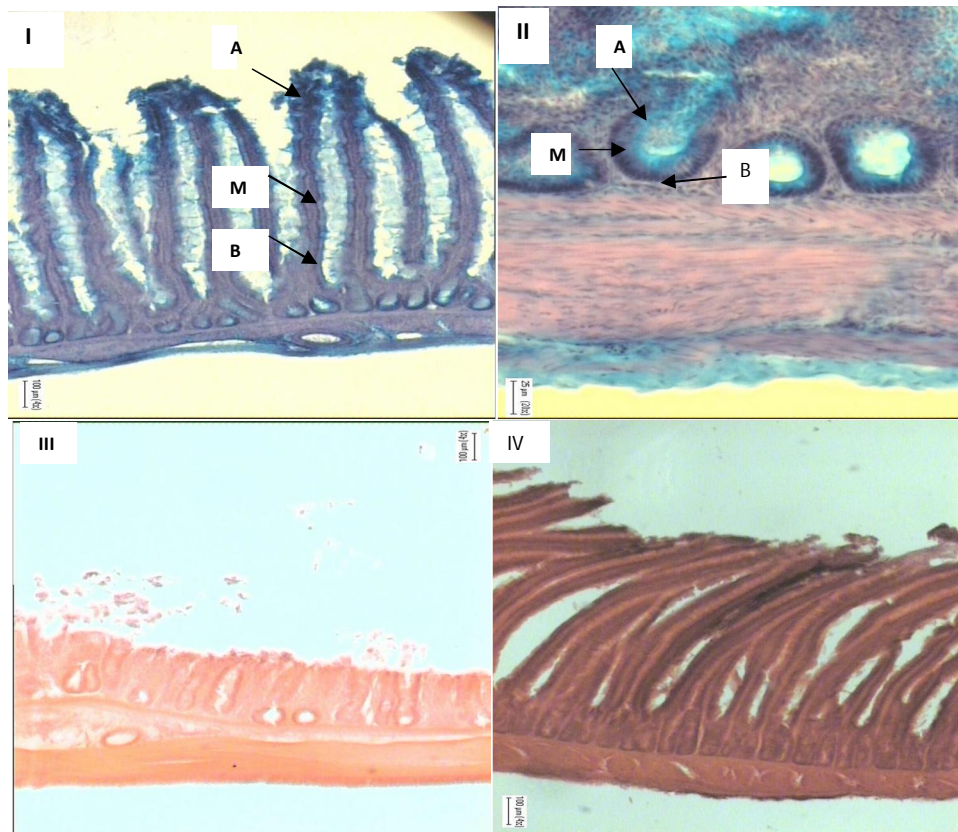
#### **2.9.3.1 Μέτρηση του πάχους του γλυκοκάλυκα**

Τρεις εγκάρσιες τομές ανά εντερικό τμήμα, με τρεις λάχνες ανά τομή και 5 τμήματα κατά μήκος κάθε λάχνης (σύνολο 135 μετρήσεις ανά επέμβαση) εξετάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Kleessen et. al (2003). Ως πάχος γλυκοκάλυκα ορίστηκε η απόσταση μεταξύ του ακραίου τμήματος του εντερικού βλεννογόνου και του εξωτερικού μέρους του γλυκοκάλυκα προς τη μεριά του εντερικού αυλού και εκφράστηκε σε  $\mu\text{m}$ . Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κάτω από αντικειμενικά κριτήρια από τον ίδιο παρατηρητή.

#### **2.9.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός της έντασης χρώσης του γλυκοκάλυκα**

Η ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα προσδιορίστηκε ημιποσοτικά χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα 4 επιπέδων: επίπεδο 0 που αντιστοιχεί σε μη χρώση του γλυκοκάλυκα, επίπεδο 1 που αντιστοιχεί σε μέτρια χρώση του γλυκοκάλυκα, επίπεδο 2 που αντιστοιχεί σε επαρκή χρώση του γλυκοκάλυκα και επίπεδο 3 που αντιστοιχεί σε πλήρη χρώση του γλυκοκάλυκα. Τρεις τομές ανά δείγμα εντερικού τμήματος (9 περιοχές ανά εντερικό τμήμα ανά επέμβαση) που περιείχαν τρεις λάχνες και τις παρακείμενες κρύπτες εξετάστηκαν. Κάθε λάχνη και κρύπτη χωρίστηκε περαιτέρω σε τρία ισομεγέθη τμήματα: την κορυφή, τη μέση και τη βάση. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κάτω από αντικειμενικά κριτήρια από τον ίδιο παρατηρητή.

Εικόνα 5. [I] Χρώση Alcian Blue-PAS σε λάχνες από το δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 42 ημερών. [II] Χρώση Alcian Blue-PAS σε κρύπτες από τον ειλέο ορνιθίων 42 ημερών. Τα γράμματα αντιπροσωπεύουν την άκρη (A), μέση (M) and βάση (B) της λάχνης/ κρύπτης. [III] Χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης σε τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών. [IV] Χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης σε δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 ημερών.



## 2.10 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα των παραγωγικών χαρακτηριστικών (ΣΒ, ΑΣΒ, ΚΤ, ΣΕΤ, ΜΕΤ, θνησιμότητα και ΕΔΠ), των συντελεστών ειλεακής και ολικής φαινομένης πεπτικότητας και της ΦΜΕοο αναλύθηκαν σε επίπεδο κλωβού με τη χρήση γενικού γραμμικού προτύπου (GLM) για ανεξάρτητες μετρήσεις, για τη διερεύνηση της επίδρασης της επέμβασης. Τα δεδομένα που αφορούσαν τη μοριακή αναλογία και τη συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών, το ΥΛ, το ΒΚ, το λόγο ΥΛ:ΒΚ, και το πάχος του γλυκοκάλυκα αναλύθηκαν σε επίπεδο ορνιθίου χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τη διερεύνηση της επίδρασης της επέμβασης. Επιπροσθέτως, τα δεδομένα που αφορούσαν τη μοριακή αναλογία και τη συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών στο λεπτό έντερο αναλύθηκαν με τη χρήση γενικού γραμμικού προτύπου (GLM) για ανεξάρτητες μετρήσεις, για τη διερεύνηση της επίδρασης της ηλικίας (14 ή 42 ημέρες), του τμήματος (δωδεκαδάκτυλος ή ειλεός), και της αλληλεπίδρασης ηλικίας × τμήματος. Πριν τη στατιστική επεξεργασία όλων των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το τεστ Kolmogorov-Smirnov για την επιβεβαίωση της κανονικής κατανομής των μετρήσεων.

Όπου προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, η σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ των επεμβάσεων έγινε με το κριτήριο Duncan, εξετάζοντας τρία επίπεδα σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$ ,  $P \leq 0,001$ ). Η γραμμική και η τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης των πρόσθετων (ΠΣ ή ΜΑΕ) στο σιτηρέσιο αναλύθηκε με τη βοήθεια πολυωνυμικών αντιθέσεων, χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3 για το πείραμα Α και τις επεμβάσεις C, E1, E2 και E3 για το πείραμα Β. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε στατιστικό πρόγραμμα SPSS (PASW Statistics 17.0.2, SPSS Inc., Chicago, USA).

Τα δεδομένα που αφορούν την ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα αναλύθηκαν ξεχωριστά με ένα γενικευμένο γραμμικό μοντέλο σε μια προσπάθεια μιας αναλυτικής περιγραφής της κατανομής των μετρήσεων. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε επέτρεψε την εξάρτηση των μέσων όρων των μετρήσεων σε γραμμικές συναρτήσεις πρόβλεψης (όπως η επέμβαση, η ηλικία, το τμήμα του εντέρου ανά ηλικία και το τμήμα της λάχνης/ κρύπτης ανά τμήμα εντέρου) μέσω ενός μη γραμμικού τρόπου σύνδεσης (log). Για την αντιπροσωπευτική διασπορά των συγκεκριμένων δεδομένων,

εξετάστηκαν η κατανομή Poisson και η αρνητική διωνυμική κατανομή. Η καταλληλότητα του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη διαίρεση της απόκλισης με τους βαθμούς ελευθερίας, με τις αποδεκτές τιμές να κυμαίνονται από 1,12 και 1,32 για τις κρύπτες και τις λάχνες αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται σαν μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων. Τα δεδομένα των μετρήσεων για τις λάχνες αναλύθηκαν ως έχουν, ενώ για τις κρύπτες, μια μετατροπή των μετρήσεων (μέτρηση  $\times 2$ ) κρίθηκε απαραίτητη. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας GENMODE στο στατιστικό πρόγραμμα SAS/STAT (Version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Για την παρουσίαση, επισυνάπτονται οι δημοσιευμένες εργασίες που προέκυψαν στο πλαίσιο του κάθε πειράματος, συνοδευόμενες από μια σύντομη περιγραφή και ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετως, παραθέτονται μη δημοσιευμένα, μέχρι σήμερα, αποτελέσματα καθώς και ένας γενικός σχολιασμός για το σύνολο της διδακτορικής διατριβής.

### **3.1 Σύντομη περιγραφή άρθρου: Effect of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins and cecal microflora composition.**

**Υλικά και Μέθοδοι.** Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τριών (3) διαφορετικών επιπέδων προσθήκης ενός πολυστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών και των συντελεστών φαινομένης πεπτικότητας ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Πεντακόσια είκοσι πέντε (525) αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 μίας μέρας τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 πειραματικές επεμβάσεις, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά ως: ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη πρόσθετων διατροφής (μάρτυρας, C), ΒΣ με προσθήκη  $10^8$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P1), ΒΣ με προσθήκη  $10^9$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P2), ΒΣ με προσθήκη  $10^{10}$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση A). Τα σιτηρέσια των ορνιθίων (ΒΣ) ήταν βασισμένα στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο (44% ολική πρωτεΐνη), παρασκευάστηκαν σε αλευρώδη μορφή, χωρίς την προσθήκη κοκκιδιοστατικού, ενώ η διατροφή έγινε κατά βούληση.

**Αποτελέσματα.** Όσον αφορά τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, εξετάστηκαν το ΣΒ, ΚΤ και ο ΣΕΤ, οριζόμενος ως ΚΤ:ΑΣΒ (g:g) των ορνιθίων για κάθε παραγωγική φάση και για το σύνολο του πειράματος. Επίσης προσδιορίστηκαν οι συντελεστές της ειλεακής φαινομένης πεπτικότητας για ξηρά ουσία (ΦΠξο), αζωτούχες ουσίες (ΦΠαο) και ολικές λιπαρές ουσίες (ΦΠλο) και ολικής φαινομένης πεπτικότητας για ξηρά ουσία, οργανική ουσία (Φποο), τέφρα (Φπτε), αζωτούχες ουσίες, ολικές λιπαρές ουσίες και ΕΝΕΟ (ΦΠενο) καθώς και η φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια των πτηνών (ΦΜΕοο). Οι τιμές της ΦΟΠαο και της ΦΜΕοο έχουν διορθωθεί για τις τιμές του αζώτου του ουρικού οξέος των περιττωμάτων.

**Παραγωγικά χαρακτηριστικά.** Το σωματικό βάρος των ορνιθίων δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των πειραματικών επεμβάσεων κατά τη φάση έναρξης. Αντίθετα, κατά τη φάση ανάπτυξης, τα ορνίθια με το χαμηλότερο επίπεδο προσθήκης ΠΣ είχαν υψηλότερο ΣΒ ( $P \leq 0,01$ ) από τα ορνίθια των υπόλοιπων επεμβάσεων, οι οποίες δε διέφεραν μεταξύ τους. Αντίστοιχα, για τη φάση πάχυνσης και για όλη τη διάρκεια του πειράματος, η επέμβαση P1 είχε υψηλότερο ΣΒ ( $P \leq 0,05$ ) σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C, P2 και P3. Η επέμβαση A είχε ενδιάμεση τιμή και

δε διέφερε σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Δεν υπήρχε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με την ΚΤ για όλες τις παραγωγικές φάσεις και για τη συνολική διάρκεια του πειράματος. Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων παρατηρήθηκε στον ΣΕΤ κατά τις φάσεις ανάπτυξης ( $P \leq 0,001$ ) και πάχυνσης ( $P \leq 0,05$ ). Πιο συγκεκριμένα, και στις δύο φάσεις, η επέμβαση P1 είχε καλύτερο (χαμηλότερο) ΣΕΤ σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα και τις υπόλοιπες επεμβάσεις των προβιοτικών, ενώ η τιμή στην επέμβαση της αβιλαμυκίνης δε διέφερε από την τιμή της επέμβασης P1. Για τη συνολική διάρκεια του πειράματος, τα ορνίθια των επεμβάσεων P1 και A είχαν σημαντικά καλύτερο ( $P \leq 0,01$ ) ΣΕΤ από τα υπόλοιπα ορνίθια. Η ΑΣΒ για σύνολο του πειράματος, ήταν υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) στην επέμβαση P1 σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C, P2 και P3, ενώ η επέμβαση A είχε ενδιάμεσες τιμές και δε διέφερε από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επιπροσθέτως, Η θνησιμότητα των πτηνών για τη συνολική διάρκεια του πειράματος είχε μέσο όρο 3,6%, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων.

**Ειλεακή Φαινομένη Πεπτικότητα.** Το επίπεδο προσθήκης προβιοτικού στο σιτηρέσιο ή η χορήγηση αβιλαμυκίνης δεν επηρέασε την ειλεακή ΦΠξο. Η προσθήκη αντιβιοτικού αύξησε σημαντικά την ειλεακή ΦΠαο των ορνιθίων σε σχέση με τα ορνίθια των υπόλοιπων επεμβάσεων. Παρομοίως, η επέμβαση A είχε υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) ειλεακή ΦΠλο σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C, P1 και P2, ενώ η επέμβαση P3 είχε ενδιάμεση τιμή και δε διέφερε από την επέμβαση A.

**Ολική Φαινομένη Πεπτικότητα.** Η προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού στη διατροφή των ορνιθίων αύξησε ( $P \leq 0,01$ ) την ολική ΦΠξο σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ η προσθήκη του χαμηλότερου επιπέδου προβιοτικού και της αβιλαμυκίνης στα σιτηρέσια των πτηνών (επεμβάσεις P1 και A) αύξησε ( $P \leq 0,001$ ) τη ολική ΦΠοο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ορνίθια. Η ολική ΦΠτε των επεμβάσεων C και P3 ήταν χαμηλότερη ( $P \leq 0,001$ ) σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Η επέμβαση P3 είχε χαμηλότερη ολική ΦΠαο σε σχέση με τις επεμβάσεις C, P1 και P2, ενώ η επέμβαση A είχε ενδιάμεση τιμή και καμία στατιστική διαφορά με όλες τις επεμβάσεις. Η τιμή της ολικής ΦΠλο της επέμβασης του αντιβιοτικού είχε την υψηλότερη τιμή ( $P \leq 0,01$ ) σε σχέση με τις τιμές των επεμβάσεων C, P2 και P3, ενώ η τιμή της επέμβασης P2 είχε την χαμηλότερη τιμή και δε διέφερε μόνο από την επέμβαση του μάρτυρα.

**Σχολιασμός.** Από μια σύντομη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτουν πολλές μελέτες που εξετάζουν την επίδραση διάφορων προβιοτικών μικροοργανισμών στις αποδόσεις ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Όμως, μόνο ένας μικρός αριθμός εργασιών (Sun et al., 2005; Chichlowski et al., 2007; Mountzouris et al., 2007; Teo και Tan, 2007; Li et al., 2008) συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών έναντι αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων. Η προσθήκη της αβιλαμυκίνης στα σιτηρέσια θεωρήθηκε απαραίτητη για την εξέταση του ΠΣ ως εναλλακτική λύση για την αντικατάσταση της χρήσης υποθεραπευτικών δόσεων αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μια μέση ημερήσια κατανάλωση  $10^8$  έως  $10^9$  CFU μικροοργανισμών θεωρείται αρκετή για την αποτελεσματική επίδραση των προβιοτικών στη βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ζώων (Patterson και Burkholder, 2003). Στην παρούσα εργασία, τα ορνίθια με μέση ημερήσια κατανάλωση  $10^7$  CFU (επέμβαση P1) είχαν υψηλότερο τελικό ΣΒ και ΑΣΒ και βελτιωμένο ΣΕΤ σε σύγκριση με τα ορνίθια που κατανάλωναν ημερησίως  $10^8$  και  $10^9$  CFU (επεμβάσεις P2 και P3 αντίστοιχα). Το τελευταίο έρχεται σε αντίθεση με την εργασία των Mountzouris et al. (2007), όπου οι καλύτερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν στα ορνίθια με μέση ημερήσια κατανάλωση  $10^8$  CFU των ίδιων μικροοργανισμών. Μια πιθανή εξήγηση της διαφοράς μεταξύ των δύο μελετών, είναι ότι στη μελέτη των Mountzouris et al. (2007), σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη, η χρησιμοποίηση του κοκκιδιοστατικού νατριούχου σαλινομυκίνης και οι αντιβιοτικές της ιδιότητες είχαν ως συνέπεια υψηλότερες συγκεντρώσεις προβιοτικού να είναι απαραίτητες για την επίδραση στις αποδόσεις των πτηνών.

Εξίσου σημαντική για την αποτελεσματικότητα ενός ΠΣ είναι και η διερεύνηση της βέλτιστης δόσης χορήγησης. Η αύξηση της δόσης διάφορων προβιοτικών μικροοργανισμών δεν δίνουν πάντα σαφή συμπεράσματα για την επίδραση στις αποδόσεις των ζώων. Υπάρχουν φορές τα υψηλά επίπεδα προσθήκης είναι περισσότερο (Teo και Tan, 2007) ή λιγότερο (Apata, 2008) αποτελεσματικά, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις όπου η αύξηση του επιπέδου δεν επηρεάζει τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων. Γενικά είναι δύσκολη η σύγκριση διαφορετικών μικροοργανισμών και διαφορετικών επιπέδων χορήγησης, επειδή η αποτελεσματικότητα ενός ΠΣ εξαρτάται από διάφορους παράγοντες.

Η βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ορνιθίων στις επεμβάσεις P1 και A συνδέεται με τους υψηλότερους συντελεστές της ολικής φαινομένης πεπτικότητας και ενέργειας. Γενικά, οι συντελεστές της ολικής φαινομένης πεπτικότητας των επεμβάσεων P1 και A είχαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις επεμβάσεις P2 και P3. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο αυξημένος μικροβιακός πληθυσμός χρειάζεται περισσότερα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του, με αποτέλεσμα λιγότερα θρεπτικά συστατικά να είναι διαθέσιμα για την ανάπτυξη του ξενιστή.

**Συμπεράσματα.** Το υπό εξέταση ΠΣ βελτίωσε τα παραγωγικά χαρακτηριστικά και τους συντελεστές φαινομένης πεπτικότητας και της ενέργειας ορνιθίων κρεοπαραγωγής, όταν χορηγήθηκε σε σιτηρέσια που δεν περιείχαν κοκκιδιοστατικό σε συγκέντρωση  $10^8$  CFU/ kg τροφής. Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει την ανάγκη για τη διερεύνηση του επιπέδου προσθήκης ενός ΠΣ στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής, όταν σκοπός είναι η επίτευξη του επιθυμητού ωφέλιμου αποτελέσματος.



### 3.2 Σύντομη περιγραφή άρθρου: **Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers**

**Υλικά και Μέθοδοι.** Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τριών (3) διαφορετικών επιπέδων προσθήκης ενός πολυστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών που απαρτίζουν τις πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες (carbohydrate side chains) των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών, τη μορφολογία του εντερικού βλεννογόνου, την ένταση χρώσης και το πάχος του γλυκοκάλυκα που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Πεντακόσια είκοσι πέντε (525) αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb 500 μίας μέρας τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 πειραματικές επεμβάσεις, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά ως: ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη πρόσθετων διατροφής (μάρτυρας, C), ΒΣ με προσθήκη  $10^8$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P1), ΒΣ με προσθήκη  $10^9$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P2), ΒΣ με προσθήκη  $10^{10}$  CFU ΠΣ / kg τροφής (επέμβαση P3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση A). Τα σιτηρέσια των ορνιθίων (ΒΣ) ήταν βασισμένα στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο (44% ολική πρωτεΐνη) παρασκευάστηκαν σε αλευρώδη μορφή, χωρίς την προσθήκη κοκκιδιοστατικού, ενώ η διατροφή έγινε κατά βούληση.

**Αποτελέσματα.** Ως μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών ορίζεται η εκατοστιαία αναλογία του κάθε μονοσακχαριτή (ΝακΓαλ, ΝακΓλκ, Γαλ, Μαν, Φουκ και ΝακΝευ) επί του συνόλου των μονοσακχαριτών. Ως προς τη μορφολογία του εντέρου, εξετάστηκαν το ύψος λάχνης (ΥΛ, σε μm), το βάθος κρύπτης (ΒΚ, σε μm) και ο λόγος ΥΛ:ΒΚ, που αποτελεί δείκτη της απορροφητικής ικανότητας του εντέρου. Η ένταση χρώσης (αυθαίρετη κλίμακα 4 επιπέδων) και το πάχος του γλυκοκάλυκα (σε μm) βασίστηκε στη χρώση των ουδετέρων και των όξινων βλεννοπρωτεϊνών.

**Μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών.** Καμία στατιστική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δεν παρουσιάστηκε στη μοριακή αναλογία των ΝακΓλκ, ΝακΓαλ, Γαλ, Μαν, Φουκ και ΝακΝευ στις πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες, στο λεπτό έντερο ορνιθίων 14 ημερών. Αντίθετα, το ποσοστό της Μαν μειώθηκε γραμμικά στο δωδεκαδάκτυλο και τον ειλέο ( $P \leq 0,05$  και  $P \leq 0,05$  αντίστοιχα) με την αύξηση του επιπέδου χορήγησης του ΠΣ στο σιτηρέσιο των πτηνών.

Παρομοίως, δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών στο δωδεκαδάκτυλο και τον ειλεό ορνιθίων 42 ημερών.

Αντίθετα, το επίπεδο προσθήκης του ΠΣ και η προσθήκη αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο επηρέασαν τη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών στο τυφλό έντερο των ορνιθίων. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό της ΝακΓλκ μειώθηκε γραμμικά και τετραγωνικά ( $P \leq 0,05$  και  $P \leq 0,01$  αντίστοιχα) σε συνάρτηση με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης ΠΣ στο σιτηρέσιο. Ταυτόχρονα, το ποσοστό στην επέμβαση της αβιλαμυκίνης είχε ενδιάμεση τιμή και διέφερε ( $P \leq 0,05$ ) μόνο από την επέμβαση P2. Σύμφωνα με τις πολυωνυμικές αντιθέσει παρατηρήθηκε γραμμική μείωση ( $P \leq 0,001$ ) της Γαλ, ενώ οι βλεννοπρωτεΐνες της επέμβαση A είχαν περισσότερη Γαλ ( $P \leq 0,05$ ) από τις επεμβάσεις P2 και P3. Στατιστική διαφορά παρουσιάστηκε και στο ποσοστό της Φουκ, με τις επεμβάσεις P2 και P3 να έχουν υψηλότερη τιμή ( $P \leq 0,05$ ) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Παράλληλα, η Φουκ αυξήθηκε γραμμικά ( $P \leq 0,001$ ) με το επίπεδο προσθήκης ΠΣ στο σιτηρέσιο των πτηνών.

**Μορφολογία εντέρου.** Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με το ΥΛ, το ΒΚ και το λόγο ΥΛ:ΒΚ στο δωδεκαδάκτυλο και τον ειλεό ορνιθίων 14 και 42 ημερών. Αντιθέτως, το ΥΛ και το ΒΚ διέφεραν μεταξύ των επεμβάσεων ( $P \leq 0,05$  και  $P \leq 0,05$  αντίστοιχα) στο τυφλό έντερο των ορνιθίων. Το επίπεδο προσθήκης ΠΣ είχε ως αποτέλεσμα τη γραμμική μείωση ( $P \leq 0,05$ ) του ΥΛ, με την επέμβαση A να διαφέρει ( $P \leq 0,05$ ) μόνο από το μάρτυρα. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ταυτόχρονα γραμμική και τετραγωνική επίδραση ( $P \leq 0,01$  και  $P \leq 0,05$ ) στο ΒΚ, με την επέμβαση A να διαφέρει ( $P \leq 0,05$ ) μόνο από το μάρτυρα. Ο λόγος ΥΛ:ΒΚ δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη ΠΣ ή αβιλαμυκίνης στα σιτηρέσια.

**Πάχος γλυκοκάλυκα.** Το πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 ημερών, επηρεάστηκε γραμμικά και τετραγωνικά ( $P \leq 0,01$  και  $P \leq 0,001$  αντίστοιχα) με το επίπεδο προσθήκης ΠΣ. Επίσης, η επέμβαση του αντιβιοτικού διέφερε ( $P \leq 0,05$ ) από όλες τις επεμβάσεις του ΠΣ, αλλά όχι από την επέμβαση του μάρτυρα. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του ΠΣ ή της αβιλαμυκίνης στο πάχος του γλυκοκάλυκα στον ειλεό ορνιθίων 14 ημερών. Καμία στατιστική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δεν παρατηρήθηκε στα ορνίθια 42 ημερών, ανεξάρτητα του εντερικού

τμήματος που εξετάστηκε, αλλά το επίπεδο προσθήκης ΠΣ επηρέασε γραμμικά ( $P \leq 0,05$ ) του πάχους του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο.

**Ένταση χρώσης γλυκοκάλυκα.** Η ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα των εντερικών λαχνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής δεν επηρεάστηκε από την χορήγηση προβιοτικού ή της αβιλαμυκίνης, την ηλικία, ή το τμήμα του εντέρου που εξετάστηκε. Αντιθέτως, η ένταση χρώσης των ιστών διαφοροποιήθηκε μόνο ως προς το τμήμα της λάχνης (δηλαδή άκρη, κέντρο, βάση). Υψηλότερη τιμή στην ένταση χρώσης (δηλαδή περισσότερες μετρήσεις) εμφανίστηκε στην άκρη της λάχνης σε σύγκριση με την ένταση χρώσης στο μέσο και στη βάση της ( $P \leq 0,001$ ).

Αναφορικά με τις εντερικές κρύπτες των ορνιθίων, δεν παρατηρήθηκε επίδραση της επέμβασης, της ηλικίας, και του τμήματος του εντέρου στην ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα, ενώ παρατηρήθηκε μια τάση ( $P = 0,072$ ) για εντονότερη χρώση στο μέσο και τη βάση σε σύγκριση με το άκρο της κρύπτης.

**Σχολιασμός.** Η ανάλυση της μοριακής αναλογίας των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής με τις μεθόδους του Anumula (1994, 1995) χρησιμοποιείται για πρώτη φορά και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με παρόμοιες εργασίες αποδείχτηκε ιδιαίτερα δύσκολη. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ανάλυσης (υδρόλυση και HPLC) έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τη σύσταση όλης της υδατανθρακικής αλυσίδας, όχι μόνο των μονοσακχαριτών που βρίσκονται στην άκρη. Οι τελικοί μονοσακχαρίτες των υδατανθρακικών αλυσίδων προσδιορίζονται από ιστοχημικές αναλύσεις με τη χρήση λεκτινών, οι οποίες συνδέονται αποκλειστικά με συγκεκριμένους μονοσακχαρίτες. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, οι μονοσακχαρίτες ΝακΓαλ και Φουκ δεν ανιχνεύτηκαν στο έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής Ross (Sharma et al., 1997; Fernandez et al., 2000), αποτελέσματα που έρχονται σε αντίθεση με τη συγκεκριμένη εργασία. Και ενώ για τη ΝακΓαλ αιτιολογείται, επειδή αποτελεί ένα μονοσακχαρίτη που συναντάται κυρίως στο εσωτερικό μιας αλυσίδας, για τη Φουκ, αποκλειστικά τελικό μονοσακχαρίτη, τα αποτελέσματα είναι δύσκολο να ερμηνευτούν. Απο την άλλη μεριά, σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν λεκτίνες, Φουκ ανιχνεύτηκαν στο έντερο ορνιθίων μιας ημέρας (Bryk et al., 1999), χοίρων (Turck et al., 1993; Lien et al., 1997) και επίμυων (Bry et al., 1996).

Όσον αφορά τις διαφορές στα ποσοστά των ΝακΓλκ, Γαλ και Φουκ μεταξύ των επεμβάσεων αλλά και της επίδρασης του επιπέδου προσθήκης του ΠΣ (γραμμική αύξηση Γαλ, ΝακΓλκ και γραμμική μείωση Φουκ) που παρατηρήθηκαν στο τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών, μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης των πληθυσμών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* που παρατηρήθηκαν στην εργασία των Mountzouris et al. (2010). Η σύσταση των πλευρικών αλυσίδων των βλεννινών είναι αποτέλεσμα μιας συνεχούς αλληλεπίδρασης της γλυκοσυλίσωσης (Paulson και Colley, 1989) από τις γλυκοσυλ-τρανσφεράσες και της βακτηριακής αποδόμησης λόγω παραγωγής γλυκολυτικών ενζύμων (νευραμινιδάση, α-φουκοσιδάση, κ.α.) από την μικροχλωρίδα του εντέρου (Hoskins et al., 1985; Ruseler-Van Embden et al., 1989; Ruseler-Corfield et al., 1992; Van Embden et al., 1995; Ruas-Madiedo et al., 2008). Η απόδειξη ενεργότητας α- και β-γαλακτοσιδάσης στο τυφλό έντερο ορνιθίων (Mountzouris et al., 2007), η χρησιμοποίηση ΝακΓλκ αλλά όχι Φουκ από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Schwad και Ganzle, 2011) και η έλλειψη του γονιδίου *afcA*, υπεύθυνου για την παραγωγή α-φουκοσιδάσης, από το βακτήριο *B. animalis* (Ruas-Madiedo et al., 2008), που περιέχεται στο ΠΣ, μπορεί να αποτελούν στοιχεία για την εξήγηση της αλλαγής στη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών.

Το γεγονός ότι δεν υπήρχαν διαφορές (εκτός στο δωδεκαδάκτυλο των 14 ημερών) μεταξύ των επεμβάσεων στο πάχος και την ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα πιθανόν να αποτελεί ένδειξη της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής, της έκκρισης και της διάσπασης των βλεννοπρωτεϊνών. Η επίδραση του επιπέδου προσθήκης ΠΣ στο πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο των 14 αλλά όχι των 42 ημερών, σε συνδυασμό με την επίδραση στο ποσοστό της Μαν, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σε επίπεδο πολλαπλασιασμού και μετασχηματισμό των καλκοειδών κυττάρων και της συνολικής ανάπτυξης και ωρίμανσης του εντερικού επιθηλίου.

Η εντονότερη χρώση του γλυκοκάλυκα στο άκρο της λάχνης σε σχέση με τα υπόλοιπα τμήματα, ενισχύει το φυσιολογικό ρόλο των βλεννοπρωτεϊνών, δηλαδή την προστασία των εντεροκυττάρων από το περιεχόμενο του εντερικού αυλού.

Τέλος, η προσθήκη ΠΣ ή αβιλαμυκίνης δεν είχε επίδραση στη μορφολογία του λεπτού εντέρου των ορνιθίων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν ύστερα από την χορήγηση *Saccharomyces cerevisiae* (Santin et al., 2001) ή έξι διαφορετικών στελεχών του *Lactobacillus sp.* (Sieo et al., 2005) σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής.

Αντιθέτως, στο τυφλό έντερο των ορνιθίων, η αύξηση του ΥΛ σε συνάρτηση με το επίπεδο προσθήκης ΠΣ θεωρείται ωφέλιμη για την απορροφητική ικανότητα του οργάνου, ενώ το υψηλότερο ΒΚ στις επεμβάσεις του ΠΣ και του αντιβιοτικού μπορεί να σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ικανότητα ανανέωσης του εντερικού επιθηλίου (Cairnie et al., 1965; Uni et al., 1998).

**Συμπεράσματα.** Το επίπεδο προσθήκης του ΠΣ που χρησιμοποιήθηκε συνέβαλε στην τροποποίηση της μοριακής αναλογίας των μονοσακχαριτών των υδατανθρακικών πλευρικών σχηματισμών των βλεννοπρωτεϊνών και της μορφολογίας του εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Το γεγονός ότι οι αλλαγές αυτές παρουσιάστηκαν στο τυφλό έντερο, το όργανο με τη μεγαλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και μικροχλωρίδας, τονίζει το σημαντικό ρόλο των προβιοτικών στη διαμόρφωση του εντερικού οικοσυστήματος των πτηνών. Μελέτες σχετικά με την προσκόλληση και ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών σε συνδυασμό με τη σύσταση των βλεννινών μπορούν να δώσουν περισσότερες λεπτομέρειες για το μηχανισμό δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών.

### 3.3 ΜΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ Α

Τα συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των επεμβάσεων για το ΣΒ, την ΚΤ, το ΣΕΤ, την ειλεακή και ολική φαινομένη πεπτικότητα έχουν σχολιαστεί στη σύντομη περιγραφή του άρθρου Mountzouris et. al (2010). Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται επιπλέον η γραμμική – τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης στα παραγωγικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν. Επίσης, στη σύντομη περιγραφή του άρθρου Mountzouris et. al (2012a) έχουν σχολιαστεί τα αποτελέσματα για τη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών. Επιπροσθέτως, σε αυτό το κεφάλαιο, παρουσιάζεται η ολική συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών και η επίδραση της ηλικίας και του τμήματος του εντέρου στη συγκέντρωση και τη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών. Τέλος, παρουσιάζεται η επίδραση της επέμβασης, της ηλικίας, του εντερικού τμήματος και του τμήματος της λάχνης/κρύπτης στη χρώση του στρώματος της βλέννης.

**Παραγωγικά χαρακτηριστικά.** Το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο είχε τετραγωνική επίδραση ( $P < 0,05$ ) στο ΣΒ των πτηνών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, με την επέμβαση P1 να έχει την υψηλότερη τιμή, ενώ δεν επηρέασε τις υπόλοιπες παραγωγικές φάσεις, ή το σύνολο του πειράματος.

Παρόμοια με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα ( $P \leq 0,05$ ) παρατηρήθηκαν και για την ΑΣΒ. Επιπροσθέτως, στη φάση ανάπτυξης, η επέμβαση P1 είχε υψηλότερη τιμή ( $P \leq 0,01$ ) σε σχέση με τις επεμβάσεις C, P2 και P3, ενώ η τιμή της επέμβασης της αβιλαμυκίνης είχε ενδιάμεση τιμή και διέφερε σημαντικά μόνο από το μάρτυρα. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων για τις φάσεις έναρξης και πάχυνσης (Πίνακας 3.3.2.).

Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην ΚΤ των ορνιθίων με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού στο σιτηρέσιο.

Για τις φάσεις ανάπτυξης (Πίνακας 3.3.2.), πάχυνσης (Πίνακας 3.3.3.) και για τη συνολική διάρκεια του πειράματος (Πίνακας 3.3.4.), ο ΣΕΤ βελτιώθηκε εκθετικά ( $P \leq 0,05$ ) αυξάνοντας το επίπεδο του προβιοτικού στο σιτηρέσιο, με την επέμβαση P1 να έχει τη χαμηλότερη τιμή.

Τέλος, τα ορνίθια που έλαβαν το χαμηλότερο επίπεδο του προβιοτικού είχαν υψηλότερες τιμές ( $P \leq 0,05$ ) για τον Ευρωπαϊκό Δείκτη Παραγωγικότητας (ΕΔΠ) σε σχέση με τα ορνίθια του μάρτυρα (C) και των υψηλότερων επιπέδων του προβιοτικού (P2, P3) αλλά όχι από τα ορνίθια που έλαβαν αυξητικό παράγοντα αβιλαμυκίνη. Τέλος, το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο είχε εκθετική επίδραση ( $P \leq 0,001$ ) στον ΕΔΠ των ορνιθίων 42 ημερών, με την επέμβαση P1 να έχει την υψηλότερη τιμή (Πίνακας 3.3.4).

**Φαινομένη πεπτικότητα και μεταβολιστέα ενέργεια.** Το επίπεδο χορήγησης προβιοτικού δεν επηρέασε την ειλεακή φαινομένη πεπτικότητα της ξηράς ουσίας, των αζωτούχων και των λιπαρών ουσιών των ορνιθίων. Αντιθέτως, γραμμική αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) στην ολική ΦΠξο και γραμμική μείωση ( $P \leq 0,05$ ) στην ολική ΦΠαο παρατηρήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του ΠΣ στο σιτηρέσιο (Πίνακας 3.3.5.). Επίσης, το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο είχε εκθετική επίδραση ( $P \leq 0,001$ ) στην ολική ΦΠοο και ΦΠτε με την επέμβαση P1 να έχει την υψηλότερη τιμή. Τέλος, το επίπεδο χορήγησης προβιοτικού δεν είχε καμία επίδραση στην ολική ΦΠλο, την ολική ΦΠενεο και τη ΦΜΕοο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής 28 ημερών (Πίνακας 3.3.6.).

**Συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών.** Η αύξηση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο δεν επηρέασε την συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών σε κανένα εντερικό τμήμα ή καμία ηλικία. Επίσης, καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε και από την χορήγηση αβιλαμυκίνης στα ορνίθια (Πίνακας 3.3.7.).

**Επίδραση ηλικίας και εντερικού τμήματος.** Η ολική συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών του λεπτού εντέρου δεν επηρεάστηκε από το τμήμα του εντέρου (δωδεκαδάκτυλος ή ειλεός), ενώ δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση ηλικίας  $\times$  τμήματος. Αντιθέτως, η ολική συγκέντρωση των βλεννοπρωτεϊνών στα ορνίθια 14 ημερών ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση στα ορνίθια 42 ημερών. Επίσης, η ηλικία επηρέασε την μοριακή αναλογία της ΝακΓαλ και της Φουκ. Πιο συγκεκριμένα, οι εντερικές βλεννοπρωτεΐνες ορνιθίων 14 ημερών είχαν λιγότερη ΝακΓαλ ( $P \leq 0,05$ ) και περισσότερη Φουκ ( $P \leq 0,001$ ) από τα ορνίθια 42 ημερών. Επιπροσθέτως, το τμήμα του λεπτού εντέρου επηρέασε τη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά, οι βλεννίνες στο δωδεκαδάκτυλο είχαν υψηλότερη

μοριακή αναλογία ΝακΓαλ ( $P \leq 0,01$ ) και χαμηλότερη μοριακή αναλογία Γαλ σε σύγκριση με τις ειλεακές βλεννίνες. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση ηλικίας  $\times$  τμήματος στη μοριακή αναλογία των υπό εξέταση μονοσακχαριτών (Πίνακας 3.3.8.).

**Ένταση χρώσης γλυκοκάλυκα.** Η ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα των εντερικών λαχνών δεν επηρεάστηκε από την χορήγηση προβιοτικού ή αβιλαμυκίνης, την ηλικία, ή το τμήμα του εντέρου που εξετάστηκε. Αντιθέτως, το τμήμα της λάχνης (δηλαδή άκρη, μέσο, βάση λάχνης) διαφοροποίησε ( $P \leq 0,001$ ) την ένταση χρώσης των ιστών. Αναφορικά με τις εντερικές κρύπτες των ορνιθίων, δεν παρατηρήθηκε επίδραση της επέμβασης, της ηλικίας, και του τμήματος του εντέρου στην ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα, ενώ παρατηρήθηκε μια τάση ( $P=0,072$ ) για εντονότερη χρώση στο μέσο και τη βάση σε σύγκριση με το άκρο της κρύπτης (Πίνακας 3.3.9.). Τα αποτελέσματα σχολιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στο κεφάλαιο 3.2.

### 3.4 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ Α

Σύμφωνα με την παρούσα εργασία, το επίπεδο προσθήκης του ΠΣ στα σιτηρέσια, είχε ως αποτέλεσμα την τετραγωνική επίδραση της ΣΕΤ κατά τη φάση ανάπτυξης, πάχυνσης και για τη συνολική διάρκεια του πειράματος, με την επέμβαση P1 να λαμβάνει τις καλύτερες τιμές. Παρόμοια επίδραση παρουσιάστηκε και στο ΣΒ και την ΑΣΒ κατά τη φάση ανάπτυξης, με την επέμβαση P1 να έχει τις υψηλότερες τιμές. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την έρευνα του Apatha (2008), όπου καλύτερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν σε ορνίθια με χαμηλότερο επίπεδο προσθήκης ( $2, 4, 6 \times 10^9$  CFU/ kg τροφής) του μικροοργανισμού *Lactobacillus bulgaricus* στο σιτηρέσιό τους σε σύγκριση με τη δόση των  $8 \times 10^9$  CFU/ kg τροφής. Από την άλλη μεριά, αυξανόμενο επίπεδο προσθήκης *Bacillus subtilis* (Khaksefidi και Ghoorchi, 2007; Teo και Tan, 2007) ή *Saccharomyces cerevisiae* (Shareef και Al-Dabbagh, 2009) είχε ανάλογη ευεργετική επίδραση στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων. Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η συμπληρωματική χορήγηση διαφορετικών επιπέδων προβιοτικών μικροοργανισμών δεν είχε σημαντική επίδραση (Li et al., 2008) ή και αντίθετα αποτελέσματα (Huang et al., 2004). Γενικά, παράγοντες όπως η σύσταση (μονο- ή πολυστέλεχο) το είδος ή ακόμα και το στέλεχος του προβιοτικού μικροοργανισμού, το επίπεδο χορήγησης, ο τρόπος εφαρμογής, η σύσταση του



σιτηρεσίου κ.α. καθιστούν δύσκολη τη σύγκριση μεταξύ εργασιών όσον αφορά την επίδραση ενός ΠΣ στις παραγωγικές παραμέτρους πτηνών.

Όσον αφορά τον ΕΔΠ, υψηλότερη τιμή (μεγαλύτερη παραγωγικότητα) παρατηρήθηκε στην επέμβαση με το χαμηλότερο επίπεδο χορήγησης ΠΣ και διέφερε από τις επεμβάσεις C, P2 και P3, κατά 9,2, 8,0 και 8,4%, αντίστοιχα. Αυτό οφείλεται στην υψηλότερη τιμή του ΣΒ σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη τιμή του ΣΕΤ της επέμβασης P1, για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Βελτίωση του ΕΔΠ κατά 4,6% σε σχέση με το μάρτυρα παρατηρήθηκε σε ορνίθια Ross 308 42 ημερών, όταν στο σιτηρέσιό τους προστέθηκαν  $5 \times 10^8$  CFU *Bacillus subtilis* C-3102/ kg τροφής (Gracia et al., 2009). Επίσης, υψηλότερες τιμές ΕΔΠ σε σχέση με το μάρτυρα κατά 14% παρατηρήθηκαν σε ορνίθια κρεοπαραγωγής που το σιτηρέσιό τους περιείχε ένα συνδυασμό *Enterococcus faecium*, προβιοτικών βιοενεργών ουσιών και διάφορων ανοσοδιεγερτικών συστατικών (Awad et al., 2008). Αντίθετα, καμία επίδραση στον ΕΔΠ δεν παρατηρήθηκε όταν σε ορνίθια Cobb 500, χορηγήθηκε το ΠΣ της παρούσας εργασίας στο νερό για τις 3 πρώτες μέρες ζωής σε συνδυασμό με το μίγμα από τους Awad et al., (2008) που προαναφέρθηκε, σε δοσολογία 1, 0,5 και 0,25 g/kg τροφής για τη φάση έναρξης, ανάπτυξης και πάχυνσης αντίστοιχα (Peric et al., 2010).

Η τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης ΠΣ στην ολική ΦΠοο και την ολική ΦΠτε και η γραμμική μείωση της ολικής ΦΠαο, με την επέμβαση P1 να έχει τις υψηλότερες τιμές, μπορεί να αιτιολογήσει το υψηλότερο ΣΒ, την υψηλότερη ΑΣΒ και το βελτιωμένο ΣΕΤ των ορνιθίων της επέμβασης P1 κατά τη φάση ανάπτυξης.

Η ολική συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη ΠΣ ή αβιλαμυκίνης, το υπό εξέταση εντερικό τμήμα (δωδεκαδάκτυλος ή ειλέος) ή την ηλικία (14 ή 42 ημέρες), αν και αυξημένες συγκεντρώσεις παρουσιάστηκαν στον ειλέο και σε ορνίθια 14 ημερών. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια επίδραση της ηλικίας και του εντερικού τμήματος στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών, ενώ η αλληλεπίδραση τμήματος  $\times$  ηλικίας δε φάνηκε να διαφοροποιεί τη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών.

Όσον αφορά την ηλικία, η μοριακή αναλογία της NakΓαλ ήταν μικρότερη και η μοριακή αναλογία της Φουκ ήταν υψηλότερη στο λεπτό έντερο ορνιθίων 42 ημερών. Επίσης αριθμητική μείωση παρατηρήθηκε και στη μοριακή αναλογία της NakΓλκ στις 42 ημέρες. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που ανέλυσε την επίδραση της ηλικίας

στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών εντερικών βλεννοπρωτεϊνών σε ορνίθια κρεοπαραγωγής, και η σύγκριση με άλλες εργασίες δεν ήταν εφικτή. Οι Shub et al., (1983) ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν τη χημική σύσταση των βλεννινών στο λεπτό έντερο επίμυων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, νεογέννητοι επίμυες είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση Φουκ και υψηλότερη συγκέντρωση ΝακΓαλ σε σχέση με επίμυες 60 ημερών, ενώ οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων μονοσακχαριτών δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές. Αν και τα αποτελέσματα δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμα, λόγω διαφορετικότητας του πειραματικού υλικού και των χρονικών περιόδων που εξετάστηκαν, μπορούμε να πούμε ότι συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, εκτός από την αύξηση της ΝακΓαλ. Παρόμοια αποτελέσματα, όπως αύξηση της εκατοστιαίας αναλογίας της Φουκ και καμία μεταβολή στην εκατοστιαία αναλογία του ΝακΝευ των βλεννοπρωτεϊνών του παχέος εντέρου παρατηρήθηκε σε χοίρους 180 ημερών σε σύγκριση με νεογέννητα χοιρίδια (Turck et al., 1993).

Επιπροσθέτως, κοινά σημεία παρατηρούνται και στις μοριακές αναλογίες των μονοσακχαριτών στις 3 εργασίες. Πιο συγκεκριμένα η μοριακή αναλογία της Φουκ αυξήθηκε από 6,5, 5,5 και 5% στα επίπεδα του 12,9, 12,3 και 17% στην παρούσα εργασία, στην εργασία των Shub et al. (1983) και την εργασία των Turck et al. (1993) αντίστοιχα, ενώ παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά συμμετοχής του ΝακΝευ και της ΝακΓλκ στις υδατανθρακικές αλυσίδες.

Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 1.2, η ΝακΓαλ συναντάται στο εσωτερικό μέρος μιας υδατανθρακικής αλυσίδας, ως σημείο σύνδεσης του προϊόντος γλυκοζυλίωσης με το πρωτεϊνικό τμήμα των βλεννινών μέσω σερίνης ή/και θρεονίνης, αλλά και ως τελικός μονοσακχαρίτης. Το μειωμένο ποσοστό της ΝακΓαλ στο λεπτό έντερο ορνιθίων 42 ημερών, μπορεί να υποδηλώνει ένα μικρότερο αριθμό πλευρικών αλυσίδων στο μόριο των βλεννοπρωτεϊνών ή ένα μικρότερο αριθμό αλυσίδων με την ΝακΓαλ ως τερματικό μονοσακχαρίτη. Περαιτέρω ανάλυση με τη βοήθεια λεκτινών από *Dolichos biflorus* (Sharma et al., 1997, Fernandez et al., 2000), η εξέταση της ενεργότητας της N-ακετυλ-γαλακτοζαμινιδάσης του περιεχομένου του εντερικού αυλού (Englyst et al., 1987), και ο ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων στελεχών ωφέλιμων και παθογόνων βακτηρίων, υπεύθυνων για την παραγωγή του ενζύμου (Ruseler-van Embden et al., 1989; Ashida et al., 2008), θα δώσει περισσότερες

διευκρινήσεις για τη θέση της ΝακΓαλ και για τη μείωση του ποσοστού στις υδατανθρακικές αλυσίδες των ορνιθίων 42 ημερών.

Εκτός της ηλικίας, η μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών επηρεάστηκε από το τμήμα του εντέρου που εξετάστηκε. Πιο συγκεκριμένα, οι βλεννοπρωτεΐνες του δωδεκαδακτύλου έχουν μικρότερο ποσοστό Γαλ και μεγαλύτερο ποσοστό ΝακΓαλ και ΝακΓλκ (αριθμητικό) σε σύγκριση με τις βλεννοπρωτεΐνες του ειλεού. Στα ορνίθια, αποίκηση βακτηριακών πληθυσμών έχει εντοπιστεί κυρίως στον πρόλοβο (Guan et al., 2003), τον ειλέο (Olsen et al., 2008) και το τυφλό έντερο (Gabriel et al., 2006) με συγκεντρώσεις  $10^8$ ,  $10^8$ - $10^9$  και  $10^{11}$  CFU/ g εντερικού περιεχομένου αντίστοιχα. Επομένως, οι αλλαγές αυτές μπορεί να οφείλονται στην εντερική μικροχλωρίδα μέσω των διαδικασιών της βακτηριακής επίδρασης στην γλυκοζυλίωση (Gheri Bryk et al., 1999; Freitas et al., 2005), στην αποδόμηση (Hoskins et al., 1985; Ruseler-Van Embden et al., 1989; Ruseler-Van Embden et al., 1995; Ruas-Madiedo et al., 2008) και τη γονιδιακή έκφραση (Mack et al., 1999 και 2003) των βλεννοπρωτεϊνών.

Πίνακας 3.3.5. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την εναρκτήρια φάση, 0-14 ημέρες.

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5,6</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P<sub>linear</sub></i>	<i>P<sub>quadratic</sub></i>
Σωματικό Βάρος <sup>2,3</sup>	434	427	422	421	413	5,7	ΜΣ	ΜΣ
Αύξηση Σωμ/κού Βάρους	384	377	372	371	363	5,7	ΜΣ	ΜΣ
Κατανάλωση Τροφής	645	682	667	694	636	12,0	ΜΣ	ΜΣ
Συντ/στής Εκμετάλλευσης	1,68	1,81	1,79	1,87	1,76	0,030	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση.

<sup>3</sup>Το σωματικό βάρος, η αύξηση του σωματικού βάρους και η κατανάλωση τροφής εκφράζονται σε g, ενώ ο συντελεστής εκμετάλλευσης είναι καθαρός αριθμός.

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>6</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.

Πίνακας 3.3.6. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την φάση ανάπτυξης 15-28 ημέρες

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5,6</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P<sub>linear</sub></i>	<i>P<sub>quadratic</sub></i>
Σωματικό Βάρος <sup>2,3</sup>	1235 <sup>A</sup>	1338 <sup>B</sup>	1275 <sup>A</sup>	1274 <sup>A</sup>	1285 <sup>A</sup>	12,7	ΜΣ	*
Αύξηση σωμ/κού Βάρους	819 <sup>A</sup>	911 <sup>C</sup>	852 <sup>AB</sup>	853 <sup>AB</sup>	872 <sup>BC</sup>	11,1	ΜΣ	*
Κατανάλωση Τροφής	1425	1433	1420	1475	1409	16,0	ΜΣ	ΜΣ
Συντ/στής εκμετάλλευσης	1,74 <sup>D</sup>	1,57 <sup>A</sup>	1,67 <sup>BC</sup>	1,73 <sup>CD</sup>	1,62 <sup>AB</sup>	0,010	ΜΣ	***

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση. Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με P≤0,05, ενώ μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B, C) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με P≤0,01.

<sup>3</sup>Το σωματικό βάρος, η αύξηση του σωματικού βάρους και η κατανάλωση τροφής εκφράζονται σε g, ενώ ο συντελεστής εκμετάλλευσης είναι καθαρός αριθμός.

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> \*= P≤0,05, \*\*= P≤0,01, \*\*\*= P≤0,001, ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>6</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.

Πίνακας 3.3.7. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την φάση πάχυνσης, 29-42 ημέρες.

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5,6</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P<sub>linear</sub></i>	<i>P<sub>quadratic</sub></i>
Σωματικό Βάρος <sup>2,3</sup>	2215 <sup>a</sup>	2343 <sup>b</sup>	2213 <sup>a</sup>	2217 <sup>a</sup>	2280 <sup>ab</sup>	28,8	ΜΣ	ΜΣ
Αύξηση σωμ/κού Βάρους	962	1005	939	943	995	19,3	ΜΣ	ΜΣ
Κατανάλωση Τροφής	2024	1999	1948	1992	1977	21,1	ΜΣ	ΜΣ
Συντ/στής εκμετάλλευσης	2,10 <sup>b</sup>	1,99 <sup>a</sup>	2,08 <sup>ab</sup>	2,11 <sup>b</sup>	1,99 <sup>a</sup>	0,013	ΜΣ	*

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση. Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με  $P \leq 0,05$ , ενώ μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B, C) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με  $P \leq 0,01$ .

<sup>3</sup>Το σωματικό βάρος, η αύξηση του σωματικού βάρους και η κατανάλωση τροφής εκφράζονται σε g, ενώ ο συντελεστής εκμετάλλευσης είναι καθαρός αριθμός.

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> \* =  $P \leq 0,05$ , \*\* =  $P \leq 0,01$ , \*\*\* =  $P \leq 0,001$ , ΜΣ = Μη σημαντική.

<sup>6</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.

Πίνακας 3.3.8. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος, 0-42 ημέρες.

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>5</sup>	Σημαντικότητα <sup>6,7</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P</i> <sub>linear</sub>	<i>P</i> <sub>quadratic</sub>
Σωματικό Βάρος <sup>2,3</sup>	2215 <sup>a</sup>	2343 <sup>b</sup>	2213 <sup>a</sup>	2217 <sup>a</sup>	2280 <sup>ab</sup>	28,8	ΜΣ	ΜΣ
Αύξηση σωμ/κού Βάρους	2165 <sup>a</sup>	2293 <sup>b</sup>	2163 <sup>a</sup>	2167 <sup>a</sup>	2230 <sup>ab</sup>	27,9	ΜΣ	ΜΣ
Κατανάλωση Τροφής	4093	4114	4036	4161	4022	30,8	ΜΣ	ΜΣ
Συντ/στής εκμετάλλευσης	1,89 <sup>B</sup>	1,80 <sup>A</sup>	1,87 <sup>B</sup>	1,92 <sup>B</sup>	1,80 <sup>A</sup>	0,015	ΜΣ	**
Θνησιμότητα	2,86	4,76	2,86	0,95	6,67	3,131	ΜΣ	ΜΣ
ΕΔΠ <sup>4</sup>	271 <sup>a</sup>	296 <sup>b</sup>	274 <sup>a</sup>	273 <sup>a</sup>	281 <sup>ab</sup>	7,7	ΜΣ	***

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση. Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με P≤0,05, ενώ μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B, C) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με P≤0,01.

<sup>3</sup>Το σωματικό βάρος, η αύξηση του σωματικού βάρους και η κατανάλωση τροφής εκφράζονται σε g, η θνησιμότητα σε ποσοστό (%), ενώ ο συντελεστής εκμετάλλευσης και ο Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας (ΕΔΠ) είναι καθαροί αριθμοί.

<sup>4</sup>ΕΠΔ= ΣΒ (kg) × Βιωσιμότητα (%) × 100 / Ηλικία (ημέρες) × ΣΕ.

<sup>5</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>6</sup> \*= P≤0,05, \*\*= P≤0,01, \*\*\*= P≤0,001, ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>7</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.

Πίνακας 3.3.5. Ειλεακή φαινομένη πεπτικότητα ορνιθίων κρεοπαραγωγής 28 ημερών.

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5,6</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P<sub>linear</sub></i>	<i>P<sub>quadratic</sub></i>
Ξηρά ουσία <sup>2,3</sup>	0,63	0,66	0,66	0,64	0,68	0,022	ΜΣ	ΜΣ
Αζωτούχες ουσίες	0,73 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>	0,78 <sup>b</sup>	0,018	ΜΣ	ΜΣ
Λιπαρές ουσίες	0,63 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,69 <sup>ab</sup>	0,78 <sup>b</sup>	0,047	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση. Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με  $P \leq 0,05$ , ενώ μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B, C) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με  $P \leq 0,01$ .

<sup>3</sup>Οι μέσοι όροι των εξεταζόμενων παραμέτρων εκφράζονται σαν καθαροί αριθμοί.

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>6</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.



Πίνακας 3.3.6. Ολική φαινομένη πεπτικότητα και φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια ορνιθίων κρεοπαραγωγής 28 ημερών

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5,6</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P</i> <sub>linear</sub>	<i>P</i> <sub>quadratic</sub>
Ξηρά ουσία <sup>2,3</sup>	0,70 <sup>A</sup>	0,75 <sup>B</sup>	0,74 <sup>B</sup>	0,75 <sup>B</sup>	0,77 <sup>B</sup>	0,012	*	ΜΣ
Οργανική ουσία	0,72 <sup>A</sup>	0,74 <sup>B</sup>	0,72 <sup>A</sup>	0,72 <sup>A</sup>	0,74 <sup>B</sup>	0,030	**	***
Τέφρα	0,38 <sup>A</sup>	0,50 <sup>B</sup>	0,47 <sup>B</sup>	0,41 <sup>A</sup>	0,48 <sup>B</sup>	0,022	ΜΣ	***
Αζωτούχες ουσίες	0,69 <sup>b</sup>	0,69 <sup>b</sup>	0,68 <sup>b</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,67 <sup>ab</sup>	0,019	*	ΜΣ
Λιπαρές ουσίες	0,65 <sup>AB</sup>	0,71 <sup>BC</sup>	0,60 <sup>A</sup>	0,70 <sup>B</sup>	0,77 <sup>A</sup>	0,029	ΜΣ	ΜΣ
ΕΝΕΟ	0,81	0,84	0,83	0,84	0,84	0,012	ΜΣ	ΜΣ
ΦΜΕοο	12,3 <sup>a</sup>	12,7 <sup>ab</sup>	12,9 <sup>b</sup>	12,7 <sup>ab</sup>	13,2 <sup>b</sup>	0,24	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση. Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με P≤0,05, ενώ μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (A, B, C) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με P≤0,01.

<sup>3</sup>Οι μέσοι όροι των εξεταζόμενων παραμέτρων εκφράζονται σαν καθαροί αριθμοί εκτός της ΑΜΕη που εκφράζεται σε Μj/kg.

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> \*= P≤0,05, \*\*= P≤0,01, \*\*\*= P≤0,001, ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>6</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.

Πίνακας 3.3.7. Ολική συγκέντρωση (μg/ml διαλύματος βλεννινών) των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>3</sup>	Σημαντικότητα <sup>4,5</sup>	
	C	P1	P2	P3	A		<i>P<sub>linear</sub></i>	<i>P<sub>quadratic</sub></i>
14 μέρες <sup>2</sup>								
Δωδεκαδάκτυλος	46,6	52,2	45,9	61,1	42,4	10,48	ΜΣ	ΜΣ
Ειλεός	68,1	72,1	74,4	84,3	78,8	5,30	ΜΣ	ΜΣ
42 μέρες								
Δωδεκαδάκτυλος	27,8	28,7	35,7	30,8	35,2	20,61	ΜΣ	ΜΣ
Ειλεός	27,4	54,8	29,2	48,5	35,6	12,54	ΜΣ	ΜΣ
Τυφλό έντερο	87,1	113,1	93,4	80,5	77,0	21,30	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 6 επαναλήψεις (ορνίθια) ανά επέμβαση.

<sup>3</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>4</sup> ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>5</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, P1, P2 και P3.

Πίνακας 3.3.8 Επίδραση της ηλικίας και του τμήματος του εντέρου στην συγκέντρωση και την μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών στο λεπτό έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής

	Ηλικία		Τμήμα		SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5</sup>		
	14 μέρες	42 μέρες	Δωδ/λος	Ειλεός		Ηλικία	Τμήμα	Ηλικία X Τμήμα
Συγκέντρωση <sup>1</sup>	57,3	27,6	37,2	47,7	14,95	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Μονοσακχαρίτες <sup>2</sup>								
N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη	37,0	33,6	37,0	33,6	1,25	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη	13,4	10,0	13,4	10,0	0,76	**	**	ΜΣ
Γαλακτόζη	27,4	26,9	23,9	30,3	1,26	ΜΣ	**	ΜΣ
Μαννόζη	5,3	7,9	6,0	7,2	0,95	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Φουκόζη	6,5	12,9	10,3	9,1	0,79	***	ΜΣ	ΜΣ
N-ακετυλ-νευραμινικό οξύ	10,5	8,7	9,3	9,9	1,57	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών εκφράστηκε σε µg/ml.

<sup>2</sup>Η μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό (%).

<sup>3</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 6 επαναλήψεις (ορνίθια) από την επέμβαση του μάρτυρα (επέμβαση C).

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> \*=P≤0,05, \*\*=P≤0,01, \*\*\*=P≤0,001, ΜΣ= Μη σημαντική.

Πίνακας 3.3.9. Μελέτη της επίδρασης της επέμβασης, της ηλικίας, του εντερικού τμήματος και του τμήματος της λάχνης/κρύπτης στη χρώση του στρώματος της βλέννης.

	Παράμετρος	BE <sup>5</sup>	Chi-Square	Σημαντικότητα <sup>6</sup>
Λάχνες	Επέμβαση <sup>1</sup>	4	3,92	ΜΣ
	Ηλικία <sup>2</sup>	1	0,69	ΜΣ
	Εντερικό τμήμα <sup>3</sup>	2	0,42	ΜΣ
	Τμήμα λάχνης <sup>4</sup>	2	19,50	***
Κρύπτες	Επέμβαση	4	6,59	ΜΣ
	Ηλικία	1	0,07	ΜΣ
	Εντερικό τμήμα	2	2,11	ΜΣ
	Τμήμα κρύπτης	2	5,26	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη προβιοτικού ή αντιβιοτικού, P1=ΒΣ με προσθήκη 10<sup>8</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P2= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>9</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, P3= ΒΣ με προσθήκη 10<sup>10</sup> CFU προβιοτικού/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Δύο ηλικίες εξετάστηκαν: 14 και 42 ημέρες

<sup>3</sup>Τα εξεταζόμενα εντερικά τμήματα ήταν 3: Δωδεκαδάκτυλος, ειλεός και τυφλό έντερο.

<sup>4</sup>Οι εντερικές λάχνες/κρύπτες χωρίστηκαν ε 3 τμήματα: βάση, κέντρο και άκρη.

<sup>5</sup>BE= Βαθμοί Ελευθερίας

<sup>6</sup> \* = P≤0,05, \*\* = P≤0,01, \*\*\* = P≤0,001, ΜΣ= Μη σημαντική.

#### **4.1 Σύντομη περιγραφή άρθρου: Assessment of a phytogetic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition.**

**Υλικά και Μέθοδοι.** Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης προσθήκης τριών (3) διαφορετικών επιπέδων ενός πρόσθετου διατροφής βασισμένο σε αιθέρια έλαια στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και και στους συντελεστές φαινομένης πεπτικότητας ορνιθίων κρεοπαραγωγής Cobb 500. Πεντακόσια είκοσι πέντε (525) αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής μίας μέρας τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 πειραματικές επεμβάσεις. Οι πέντε πειραματικές επεμβάσεις του πειράματος περιγράφονται αναλυτικά ως: ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη πρόσθετων διατροφής (μάρτυρας, C), ΒΣ με προσθήκη 80 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E1), ΒΣ με προσθήκη 125 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E2), ΒΣ με προσθήκη 250 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση A). Τα σιτηρέσια των ορνιθίων (ΒΣ) ήταν βασισμένα στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο (44% ολική πρωτεΐνη), παρασκευάστηκαν σε αλευρώδη μορφή, χωρίς την προσθήκη κοκκιδιοστατικού, ενώ η διατροφή έγινε κατά βούληση.

**Αποτελέσματα.** Για κάθε παραγωγική φάση και για το σύνολο του πειράματος προσδιορίστηκαν το ΣΒ, η ΑΣΒ, η ΚΤ, η ΜΕΤ οριζόμενη ως ΑΣΒ:ΚΤ (g:g) και η θνησιμότητα των ορνιθίων. Επίσης προσδιορίστηκαν οι συντελεστές της ειλεακής φαινομένης πεπτικότητας για ξηρά ουσία (ΦΠξο), αζωτούχες ουσίες (ΦΠαο) και ολικές λιπαρές ουσίες (ΦΠλο) και ολικής φαινομένης πεπτικότητας για ξηρά ουσία, οργανική ουσία (ΦΠοο), τέφρα (ΦΠτε), αζωτούχες ουσίες, ολικές λιπαρές ουσίες και ΕΝΕΟ (ΦΠενεο) καθώς και η φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια των πτηνών (ΦΜΕοο), σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. Οι τιμές της ΦΟΠαο και της ΦΜΕοο έχουν διορθωθεί για τις τιμές του αζώτου του ουρικού οξέος των περιττωμάτων.

**Παραγωγικά χαρακτηριστικά.** Κατά τις φάσεις έναρξης και ανάπτυξης, δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά για το ΣΒ, την ΑΣΒ, την ΚΤ και τη ΜΕΤ των ορνιθίων. Παρ' όλα αυτά, η ΚΤ κατά την φάση έναρξης μειώθηκε γραμμικά ( $P \leq 0,05$ ) με το επίπεδο προσθήκης MAE στο σιτηρέσιο. Κατά την φάση πάχυνσης,

παρατηρήθηκε γραμμική ( $P \leq 0,05$ ) και τετραφωνική ( $P \leq 0,05$ ) επίδραση του επιπέδου προσθήκης MAE στην ΑΣΒ. Η επέμβαση Α είχε υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) τιμή στην ΑΣΒ σε σύγκριση με τις επεμβάσεις Ε3, Ε1 και C. Αντιθέτως, γραμμική ( $P \leq 0,05$ ) και τετραγωνική ( $P \leq 0,05$ ) μείωση παρατηρήθηκε στην ΚΤ σε συνάρτηση με το επίπεδο χορήγησης MAE, ενώ η επέμβαση της αβιλαμυκίνης δε διέφερε από τις επεμβάσεις του μάρτυρα και των MAE. Η αύξηση της συγκέντρωσης MAE στο σιτηρέσιο αύξησε γραμμικά ( $P \leq 0,001$ ) τη MET κατά τη πάχυνση των ορνιθίων, ενώ η MET της επέμβαση Α παρουσιάστηκε βελτιωμένη ( $P \leq 0,05$ ) σε σύγκριση με τις επεμβάσεις Ε1 και C. Για τη συνολική διάρκεια του πειράματος, το επίπεδο προσθήκης MAE στο σιτηρέσιο επηρέασε γραμμικά την ΑΣΒ ( $P \leq 0,05$ ) και την MET ( $P \leq 0,001$ ) και τετραγωνικά ( $P \leq 0,05$ ) την ΚΤ. Η MET για τη συνολική διάρκεια του πειράματος παρουσιάστηκε βελτιωμένη ( $P \leq 0,05$ ) στις επεμβάσεις Ε2, Ε3 και Α σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C και Ε1. Τέλος, η θνησιμότητα των ορνιθίων δεν επηρεάστηκε από τις πειραματικές επεμβάσεις για κάθε παραγωγική φάση ή το σύνολο του πειράματος.

**Ειλεακή Φαινομένη Πεπτικότητα.** Δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά στην ειλεακή ΦΠξο και ΦΠαο, σε αντίθεση με τη ειλεακή ΦΠλο, όπου η επέμβαση του αντιβιοτικού είχε υψηλότερη τιμή ( $P < 0,05$ ) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες 4 επεμβάσεις.

**Ολική Φαινομένη Πεπτικότητα και Μεταβολιστέα Ενέργεια.** Η επέμβαση Α είχε υψηλότερη ΦΠλο ( $P \leq 0,05$ ) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, οι οποίες δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Υψηλότερη τιμή στην τιμή της ΦΠοο παρατηρήθηκε στην επέμβαση Ε1 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, διαφέροντας σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ) όμως μόνο από την επέμβαση του μάρτυρα. Η ΦΠτε στις επεμβάσεις Ε2 και Α ήταν υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) κατά 7,5% και 32,5% αντίστοιχα σε σχέση με το μάρτυρα, με τις επεμβάσεις Ε1 και Ε3 να έχουν ενδιάμεσες τιμές και καμία στατιστική διαφορά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

**Σχολιασμός.** Η προσθήκη 125 και 250 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση Ε2 και Ε3 αντίστοιχα) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της MET κατά 12,8% στη φάση πάχυνσης και κατά 7,4% για τη συνολική διάρκεια του πειράματος, σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ η προσθήκη της αβιλαμυκίνης είχε παρόμοια αποτελέσματα. Γενικά, βελτίωση της MET (ή του ΣΕΤ) σε ορνίθια με προσθήκη αιθερίων ελαίων στη διατροφή τους, έχουν αναφερθεί σε πολλές μελέτες που έχουν συγκεντρωθεί και αναφερθεί από τους Brenes και Roura (2010). Η βελτίωση οφείλεται στη μείωση της

KT αλλά όχι στην ΑΣΒ, σε αντίθεση με την παρούσα εργασία που και οι δύο παράγοντες επηρεάστηκαν σημαντικά για τη φάση παχυνσης και αριθμητικά για τη συνολική διάρκεια του πειράματος. Παρόμοια αποτελέσματα (επίδραση στην ΚΤ και την ΑΣΒ) παρουσιάστηκαν όταν αιθέρια έλαια ρίγανης (Giannenas et al., 2003) και αιθέρια έλαια γλυκανίσου (Ciftci et al., 2005) προστέθηκαν σε επίπεδα 300 και 400 mg / kg σιτηρεσίου ορνιθίων κρεοπαραγωγής αντίστοιχα. Επίσης, η βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών δεν παρουσιάζεται κατά τις πρώτες μέρες εκτροφής (Giannenas et al., 2003; Ciftci et al., 2005; Jamroz et al., 2005), φαινόμενο που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν περιπτώσεις (Botsoglou et al., 2003; Lee et al., 2003; Hernandez et al., 2004) όπου καμία ευεργετική επίδραση στις αποδόσεις δεν παρουσιάστηκε ύστερα από τη χορήγηση, μέσω της διατροφής, διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων στα πτηνά.

Εκτός από τις υψηλότερες τιμές της ειλεακής Φπλο, της ολικής ΦΠτε και της ολικής ΦΠλο της επέμβασης της αβιλαμυκίνης σε σύγκριση με τις επεμβάσεις των αιθερίων ελαίων και του μάρτυρα, όλοι οι υπόλοιποι συντελεστές δεν παρουσίασαν διαφορές. Επίσης, καμία στατιστική διαφορά δεν παρουσιάστηκε και στα παραγωγικά χαρακτηριστικά για την ίδια φάση (φάση ανάπτυξης), παρ' όλο που το ΣΒ και η ΑΣΒ στην επέμβαση Α είχε υψηλότερες τιμές. Η συσχέτιση της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών της τροφής με τις αποδόσεις των ζώων είναι ένα ιδιαίτερο φαινόμενο. Η πολυπλοκότητα του φαινομένου αντικατοπτρίζεται σε ποικίλες περιπτώσεις, όπου παρατηρήθηκε βελτίωση των αποδόσεων των ζώων με την προσθήκη αιθερίων ελαίων χωρίς βελτίωση των συντελεστών πεπτικότητας (Jamroz et al., 2005) ή το ανάποδο (Hernandez et al., 2004). Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι η βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών δεν οφείλεται αποκλειστικά στη χρησιμοποίηση των συστατικών της τροφής, αλλά επίσης σε παράγοντες όπως η υγεία των ζώων, η κατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας, η παραγωγή βλέννης κ.α. Οι παράγοντες αυτοί απαιτούν θρεπτικά συστατικά και ενέργεια από τον ξενιστή, που διαφορετικά θα χρησιμοποιούνταν για παραγωγικούς σκοπούς.

**Συμπέρασμα.** Η προσθήκη 125 και 250 mg MAE /kg τροφής βελτίωσε τη μετατρεψιμότητα της τροφής κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος στα επίπεδα της χρησιμοποίησης της αβιλαμυκίνης ως αυξητικό παράγοντα, ενώ η χορήγηση 80 mg MAE /kg τροφής βελτίωσε τη ολική ΦΠοο και ΦΜΕοο σε σχέση με το μάρτυρα.

Συνολικά, η παρούσα εργασία αποδεικνύει τη σπουδαιότητα της μελέτης διαφορετικών επιπέδων χορήγησης αιθερίων ελαίων για τη βελτίωση της παραγωγικότητας μιας εκτροφής ορνιθίων κρεοπαραγωγής.



#### 4.2 Σύντομη περιγραφή άρθρου: **Modulation of intestinal composition and mucosal morphology by dietary phytogetic inclusion level in broilers.**

**Υλικά και Μέθοδοι.** Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τριών (3) διαφορετικών επιπέδων προσθήκης ενός πρόσθετου διατροφής βασισμένο σε αιθέρια έλαια στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών που απαρτίζουν τις πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες (carbohydrate side chains) των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών, τη μορφολογία του εντερικού βλεννογόνου, την ένταση χρώσης και το πάχος του γλυκοκάλυκα που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής Cobb 500. Πεντακόσια είκοσι πέντε (525) αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής μίας μέρας τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 πειραματικές επεμβάσεις, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά ως: ΒΣ χωρίς επιπλέον προσθήκη πρόσθετων διατροφής (μάρτυρας, C), ΒΣ με προσθήκη 80 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E1), ΒΣ με προσθήκη 125 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E2), ΒΣ με προσθήκη 250 mg MAE / kg τροφής (επέμβαση E3) και ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (επέμβαση A). Τα σιτηρέσια των ορνιθίων (ΒΣ) ήταν βασισμένα στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο (44% ολική πρωτεΐνη), παρασκευάστηκαν σε αλευρώδη μορφή, χωρίς την προσθήκη κοκκιδιοστατικού, ενώ η διατροφή έγινε κατά βούληση.

**Αποτελέσματα.** Ως μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών ορίζεται η εκατοστιαία αναλογία του κάθε μονοσακχαρίτη (ΝακΓαλ, ΝακΓλκ, Γαλ, Μαν, Φουκ και ΝακΝευ) επί του συνόλου των μονοσακχαριτών. Ως προς τη μορφολογία του εντέρου, εξετάστηκαν το ΥΛ (σε  $\mu\text{m}$ ), το ΒΚ (σε  $\mu\text{m}$ ) και ο λόγος ΥΛ:ΒΚ, που αποτελεί δείκτη της απορροφητικής ικανότητας του εντέρου. Η ένταση χρώσης (αυθαίρετη κλίμακα 4 επιπέδων) και το πάχος του γλυκοκάλυκα (σε  $\mu\text{m}$ ) βασίστηκε στη χρώση των ουδετέρων και των όξινων βλεννοπρωτεϊνών.

**Μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών.** Στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 ημερών, η μοριακή αναλογία της Μαν αυξήθηκε γραμμικά ( $P \leq 0,001$ ) με το επίπεδο προσθήκης MAE στο σιτηρέσιο, ενώ οι επεμβάσεις C, E1 και A είχαν χαμηλότερη τιμή Μαν ( $P \leq 0,01$ ) από τις επεμβάσεις E2 και E3. Επίσης, η μοριακή αναλογία της ΝακΓλκ επηρεάστηκε τετραγωνικά ( $P \leq 0,05$ ) με τη χορήγηση MAE, με την επέμβαση E1 να έχει την υψηλότερη τιμή, ενώ δεν επηρεάστηκε από την χορήγηση του αντιβιοτικού. Στις βλεννοπρωτεΐνες του ειλεού ορνιθίων 14 ημερών,

παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση στη μοριακή αναλογία της Γαλ ( $P \leq 0,01$ ) και της Μαν ( $P \leq 0,05$ ) όταν αυξήθηκε το επίπεδο του ΜΑΕ στο σιτηρέσιο. Η επέμβαση Α είχε χαμηλότερη μοριακή αναλογία Γαλ ( $P \leq 0,01$ ) από τις επεμβάσεις Ε2 και Ε3, ενώ για τη Μαν η επέμβαση Α είχε ενδιάμεση τιμή και δε διέφερε από τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 42 ημερών. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε γραμμική μείωση της Φουκ ( $P \leq 0,05$ ) με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης του ΜΑΕ στο σιτηρέσιο. Τέλος, όσο αφορά τη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών, η αύξηση του επιπέδου ΜΑΕ στο σιτηρέσιο αύξησε γραμμικά ( $P \leq 0,05$ ) τη μοριακή αναλογία της ΝακΓαλ, με τις επεμβάσεις να μη διαφέρουν μεταξύ τους.

**Μορφολογία εντέρου.** Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με το ύψος της λάχνης, το βάθος της κρύπτης και το λόγο ΥΛ:ΒΚ στο δωδεκαδάκτυλο και στον ειλεό ορνιθίων 14 ημερών. Παρ' όλα αυτά, ο λόγος ΥΛ:ΒΚ αυξήθηκε γραμμικά ( $P \leq 0,05$ ) με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης του ΜΑΕ στο σιτηρέσιο. Όσον αφορά τα ορνίθια 42 ημερών, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων στα εξεταζόμενα τμήματα του εντέρου. Επιπροσθέτως, το ύψος των λαχνών του ειλεού παρουσίασε γραμμική αύξηση ( $P \leq 0,05$ ) με τη χορήγηση ΜΑΕ.

**Πάχος γλυκοκάλυκα.** Το επίπεδο προσθήκης ΜΑΕ και η προσθήκη αντιβιοτικού στο σιτηρέσιο δεν επηρέασαν το πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο και στον ειλεό ορνιθίων 14 ημερών. Στα ορνίθια 42 ημερών, το πάχος της βλέννης που περικλείει τις λάχνες του δωδεκαδάκτυλου αυξήθηκε γραμμικά ( $P \leq 0,05$ ) με την αύξηση του ποσοστού του ΜΑΕ του σιτηρεσίου, με τις επεμβάσεις να μην διαφέρουν μεταξύ τους. Τέλος, η προσθήκη του ΜΑΕ ή της αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο δεν επηρέασε το πάχος του γλυκοκάλυκα στον ειλεό και το τυφλό έντερο ορνιθίων 42 ημερών.

**Ένταση χρώσης γλυκοκάλυκα.** Η ένταση της χρώσης του γλυκοκάλυκα των εντερικών λαχνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής δεν επηρεάστηκε από την χορήγηση ΜΑΕ ή αβιλαμυκίνης, την ηλικία, ή το τμήμα του εντέρου που εξετάστηκαν. Αντιθέτως, το τμήμα της λάχνης (δηλαδή άκρη, μέσο, βάση λάχνης) επηρέασε ( $P \leq 0,001$ ) την ένταση χρώσης των ιστών. Υψηλότερη τιμή στην ένταση χρώσης (δηλαδή περισσότερες μετρήσεις) εμφανίστηκε στην άκρη της λάχνης σε σύγκριση με την ένταση της χρώσης

στο μέσο και τη βάση της. Επιπρόσθετα, η ένταση χρώσης ήταν εντονότερη στο μέσο σε σύγκριση με τη βάση της λάχνης.

Αναφορικά με τις εντερικές κρύπτες των ορνιθίων, δεν παρατηρήθηκε επίδραση της προσθήκης MAE ή αβιλαμυκίνης στο σιτηρέσιο και της ηλικίας στην ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα με τη μέθοδο Alcian Blue-PAS. Αντίθετα, η χρώση επηρεάστηκε από το τμήμα του εντέρου ( $P \leq 0,05$ ) και το τμήμα της κρύπτης ( $P \leq 0,001$ ) Πιο συγκεκριμένα, η χρώση του στρώματος της βλέννης στο δωδεκαδάκτυλο και στον ειλέο ήταν εντονότερη από τη χρώση της βλέννης στο τυφλό έντερο. Επίσης, η ένταση της χρώσης στην άκρη της κρύπτης ήταν χαμηλότερη από την ένταση στο κέντρο και τη βάση της κρύπτης.

**Σχολιασμός** Αρκετοί ερευνητές έχουν εξετάσει την επίδραση διάφορων πρόσθετων διατροφής όπως προβιοτικά (Smirnov et al., 2005), βιοενεργές προβιοτικές ουσίες (Chee et al., 2010a και 2010b), αντιβιοτικά (Smirnov et al., 2005; Chee et al., 2010a), αμινοξέα (θρεονίνη, Chee et al., 2010b) σε παραμέτρους των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Οι Jamroz et al. (2006) μελέτησαν την προσθήκη ενός MAE, που περιλάμβανε καρβακρόλη, κινναμαλδεϋδη και αιθέρια έλαια πιπεριού, στη διατροφή ορνιθίων 42 ημερών που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης βλέννης από τις γαστροεντερικές λάχνες. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που εξετάζει την επίδραση των αιθερίων ελαίων στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών.

Στο παρελθόν, η χρησιμοποίηση ιστοχημικών αναλύσεων, και πιο συγκεκριμένα τις εξειδικευμένες για κάθε μονοσακχαρίτη λεκτίνες, είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση NakΓαλ, NakΓλκ, Γαλ, Μαν, Φουκ και NakΝευ στις εντερικές βλεννοπρωτεΐνες σε ορνίθια μιας ημέρας (Gheri Bryk et al., 1999), ομοίως με την παρούσα εργασία. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα δεν έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Sharma et al. (1997) και Fernandez et al. (2000), όπου παρατήρησαν απουσία των NakΓαλ και Φουκ το έντερο ορνιθίων 5 εβδομάδων, αν και χρησιμοποίησαν την ίδια μέθοδο με τους Gheri Bryk et al. (1999). Όμοια αποτελέσματα με την παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν επίσης στο έντερο χοίρων (Turck et al., 1993), επίμυων (Shub et al., 1983) και μοσχαριών (Montagne et al., 2000).

Οι σημαντικές διαφορές που παρουσιάστηκαν στη μοριακή αναλογία της Μαν στα ορνίθια των 14 ημερών, αλλά όχι στα ορνίθια των 42 ημερών, φανερώνει μια

εντονότερη επίδραση του MAE στην N-γλυκοσυλίωση των βλεννινών στα μικρότερα πτηνά. Επίσης, οι διαφορές στις Γαλ, Φουκ και ΝακΓαλ θα πρέπει να συνδυαστούν με διάφορες παραμέτρους της εντερικής μικροχλωρίδας όπως ο πολλαπλασιασμός και ο αποικισμός συγκεκριμένων βακτηρίων. Η σύσταση των μουκινών αποτελεί ένα δυναμικό συνεχώς μεταβαλλόμενο σύστημα λόγω της αποδόμηση των βλεννινών από βακτηριακές γλυκοσιδάσες (Hoskins et al., 1985; Ruas-Madiedo et al., 2008), της χρησιμοποίησης των υδατανθράκων των πλευρικών αλυσίδων σαν πηγές ενέργειας από τα εντερικά βακτήρια (Salysers, 1979; Schwad και Gänzle, 2011; Stahl et al., 2011), τη βακτηριακή προκόλληση στους μονοσακχαρίτες των βλενοπρωτεϊνών (Kirjavainen et al., 1998; Gusils et al., 2003) και της ικανότητας της μικροχλωρίδας να επιδρά στην γλυκοσυλίωση (Bry et al., 1996; Gheri Bryk et al., 1999; Freitas et al., 2005) και τη γονιδιακή έκφραση των βλενοπρωτεϊνών (Mack et al., 1999 και 2003).

Η χρησιμοποίηση αντιβιοτικού (αβιλαμυκίνης) ως αυξητικού παράγοντα, δε φάνηκε να επηρεάζει τη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των εντερικών βλενοπρωτεϊνών, αν και έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη αβιλαμυκίνης αύξησε τον αριθμό των καλκοειδών κυττάρων και τη γονιδιακή έκφραση των βλεννινών (Smirnov et al., 2005), ενώ η χορήγηση ψευδαργυρικής βακίτρασίνης αύξησε τη συγκέντρωση των σουλφο-βλεννινών στο έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Chee et al., 2010c).

Η γραμμική αύξηση στο πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο σε συνάρτηση με το επίπεδο προσθήκης MAE στο σιτηρέσιο ορνιθίων 42 ημερών, έρχεται σε συμφωνία με την εργασία των Jamroz et al., (2006), όπου παρατηρήθηκε αυξημένη ποσότητα βλέννης στη νήστιδα ορνιθίων 21 ημερών ύστερα από τη χορήγηση MAE.

Η αυξημένη ένταση χρώσης από τη βάση προς την άκρη της λάχνης, επιβεβαιώνει τον προστατευτικό ρόλο του γλυκοκάλυκα έναντι του περιεχομένου του εντερικού αυλού, ενώ η αυξημένη ένταση χρώσης στη βάση της κρύπτης πιθανόν να σχετίζεται με τις φυσιολογικές διαδικασίες της αναπαραγωγής, της μετατροπής και της ωρίμανσης των καλκοειδών κυττάρων (Cairnie et al., 1965; Uni et al., 1998).

Τέλος, οι παράμετροι της μορφολογίας του εντέρου δεν επηρεάζονται πάντα από τη συμπληρωματική χορήγηση MAE στη διατροφή των πτηνών (Jamroz et al., 2006; Garcia et al., 2007; Peric et al., 2010). Η δοσολογία, το είδος και η συγκέντρωση των ενεργών συστατικών ενός πρόσθετου που βασίζεται σε φυτικά εκχυλίσματα

αποτελούν παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μέγεθος της επίδρασης στα πτηνά. Στην συγκεκριμένη μελέτη, το επίπεδο προσθήκης ενός MAE που βασίζεται στην καρβακρόλη, αύξησε το λόγο ΥΛ:ΒΚ στο δωδεκαδάκτυλο των ορνιθίων 14 ημερών και το ΥΛ στον ειλεό ορνιθίων 42 ημερών. Αύξηση στο ΥΛ της νήστιδας ορνιθίων Ross 308 παρουσιάστηκε όταν το σιτηρέσιό τους περιείχε αιθέρια έλαια *Zingiber officinale* (τζίντζερ) και πρόπολης (Tekeli et al., 2010).

**Συμπεράσματα** Σύμφωνα με την παρούσα εργασία, το επίπεδο προσθήκης MAE στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής, τροποποίησε τη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών, ενίσχυσε την έκκριση βλέννης στο δωδεκαδάκτυλο και είχε θετική επίδραση στη μορφολογία του εντέρου. Περαιτέρω έρευνα αναφορικά με τη σχέση παρόμοιων αλλαγών με την αλληλεπίδραση μικροχλωρίδας-ξενιστή και την οικολογία του εντέρου, θα δώσει περισσότερες πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων στη φυσιολογία των πτηνών.

### 4.3 ΜΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ Β

Τα συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των επεμβάσεων για το ΣΒ, την ΚΤ, το ΣΕΤ, την ειλεακή και ολική φαινομένη πεπτικότητα έχουν σχολιαστεί στη σύντομη περιγραφή του άρθρου Mountzouris et. al (2011). Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται επιπλέον η θνησιμότητα και ο Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας (EPEF) κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος. Επίσης, στη σύντομη περιγραφή του άρθρου Mountzouris et. al (2012b) έχουν σχολιαστεί τα αποτελέσματα για τη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών. Επιπροσθέτως, σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται η ολική συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών και η επίδραση της ηλικίας και του τμήματος του εντέρου στην συγκέντρωση και την μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών.

**Παραγωγικά χαρακτηριστικά.** Η θνησιμότητα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη ΜΑΕ ή αβιλαμυκίνης στα σιτηρέσια, ενώ ο η μέση θνησιμότητα του πειράματος κυμάνθηκε σε αποδεκτά επίπεδα (5,3%, Πίνακας 4.3.1).

Επίσης, υψηλότερος ΕΔΠ παρουσιάστηκε στα ορνίθια ηλικίας 42 ημερών ύστερα από την προσθήκη αβιλαμυκίνης ή ΜΑΕ σε συγκέντρωση 125 mg/kg τροφής σε σχέση με το μάρτυρα και τη προσθήκη ΜΑΕ σε συγκέντρωση 85 mg /kg τροφής (Πίνακας 4.3.1).

**Συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών.** Η αύξηση του επιπέδου προσθήκης του ΜΑΕ στο σιτηρέσιο δεν επηρέασε την συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών σε κανένα εντερικό τμήμα ή ηλικία. Επίσης, καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε και από την χορήγηση αβιλαμυκίνης στα ορνίθια (Πίνακας 4.3.2).

**Επίδραση της ηλικίας και του εντερικού τμήματος.** Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών του λεπτού εντέρου δεν επηρεάστηκε από την ηλικία (14 ή 42 ημέρες) ή το τμήμα του εντέρου (δωδεκαδάκτυλος ή ειλεός), ενώ δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση ηλικίας × τμήματος. Αντίθετα, η ηλικία επηρέασε την μοριακή αναλογία της ΝακΓαλ και της Φουκ. Πιο συγκεκριμένα, οι εντερικές βλεννοπρωτεΐνες ορνιθίων 14 ημερών έχουν λιγότερη ΝακΓαλ ( $P \leq 0,05$ ) και περισσότερη Φουκ ( $P \leq 0,001$ ) από τα ορνίθια 42 ημερών. Επιπροσθέτως, το τμήμα του

λεπτού εντέρου επηρέασε τη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά, οι βλεννίνες στο δωδεκαδάκτυλο έχουν υψηλότερη μοριακή αναλογία εξοζαμινών (ΝακΓλκ και ΝακΓαλ με  $P \leq 0,01$  και  $P \leq 0,001$  αντίστοιχα) και χαμηλότερη μοριακή αναλογία Γαλ ( $P \leq 0,05$ ) σε σύγκριση με τις ειλεακές βλεννίνες. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση ηλικίας  $\times$  τμήματος στη μοριακή αναλογία των υπό εξέταση μονοσακχαριτών (Πίνακας 4.3.3).

#### 4.4 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ Β

Τα ορνίθια της επέμβασης E2 εμφάνισαν υψηλότερο ΕΔΠ από τις επεμβάσεις C και E1 κατά 10,2 και 13,2% αντίστοιχα. Όταν το ίδιο ΜΑΕ προστέθηκε σε επίπεδο 125 mg/ kg τροφής σε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο, ο ΕΔΠ βελτιώθηκε ( $P > 0,01$ ) κατά 4,2% σε σχέση με το μάρτυρα (269 έναντι 258, Peric et al., 2010). Βελτιωμένος ( $P \leq 0,1$ ) κατά 16,9% σε σχέση με το μάρτυρα και κατά 8,4% σε σχέση με την προσθήκη αντιβιοτικού αυξητικού παράγοντα, παρουσιάστηκε ο ΕΔΠ ορνιθίων όταν προστέθηκαν 250 ppm φυτικών εκχυλισμάτων σκόρδου και κρεμμυδιού σε σιτηρέσια που βασίστηκαν σε αραβόσιτο και σογιάλευρο (G-PRO naturo, Kumar et al., 2010). Αντίθετα, καμία επίδραση στον ΕΔΠ δεν προκάλεσε η προσθήκη φυτικών εκχυλισμάτων των *Ginkgo biloba* και *Hypericum perforatum* στα σιτηρέσια ορνιθίων 35 ημερών, εμβολιασμένα με το παθογόνο *Clostridium perfringens* (Van Heerden, 2009).

Η προσθήκη ΜΑΕ ή αβιλαμυκίνης, η ηλικία (14 ή 42 ημέρες) ή το εντερικό τμήμα (δωδεκαδάκτυλος ή ειλεός) δεν επηρέασε την ολική συγκέντρωση των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια επίδραση της ηλικίας και του εντερικού τμήματος στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών, ενώ η αλληλεπίδραση τμήματος  $\times$  ηλικίας δε φάνηκε να διαφοροποιεί τη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών.

Όσον αφορά την ηλικία, το ποσοστό συμμετοχής της ΝακΓαλ ήταν υψηλότερο και το ποσοστό συμμετοχής της Φουκ στις πλευρικές δομικές μονάδες των βλεννοπρωτεϊνών ήταν χαμηλότερο στο λεπτό έντερο ορνιθίων 14 ημερών. Επίσης

αριθμητική μείωση παρατηρήθηκε και στη μοριακή αναλογία της ΝακΓλκ στις 42 ημέρες. Η επίδραση της ηλικίας στη βιοχημική σύσταση των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών έχει μελετηθεί σε επίμυες (Shub et al., 1983) και χοίρους (Turck et al., 1993), αλλά όχι σε ορνίθια κρεοπαραγωγής. Σύμφωνα τους Shub et al. (1983), χαμηλότερη συγκέντρωση Φουκ και υψηλότερη συγκέντρωση ΝακΓαλ παρατηρήθηκαν στο λεπτό έντερο επίμυων μιας μέρας σε σχέση με επίμυες 60 ημερών, ενώ οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων μονοσακχαριτών δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές. Επίσης, στο παχύ έντερο χοίρων 180 ημερών παρατηρήθηκε αύξηση της εκατοστιαίας αναλογίας της Φουκ και καμία μεταβολή στην εκατοστιαία αναλογία του ΝακΝευ των υδατανθρακικών αλυσίδων σε σύγκριση με νεογέννητα χοιρίδια (Turck et al., 1993).

Στην παρούσα εργασία, η μοριακή αναλογία της Φουκ αυξήθηκε κατά 116% στο έντερο ορνιθίων 42 ημερών σε σχέση με το έντερο ορνιθίων 14 ημερών. Ομοίως, αύξηση της Φουκ κατά 123% και 240% παρατηρήθηκε στις εργασίες των Shub et al. (1983) και Turck et al. (1993), ενώ τα ποσοστά της Φουκ στα νεότερα ζώα κυμάνθηκε στα επίπεδα του  $5,5 \pm 0,5\%$  και για τις 3 μελέτες. Σε συνδυασμό με τα παρόμοια ποσοστά που παρουσιάστηκαν για την Νακ Γλκ ( $30 \pm 5\%$ ) και το ΝακΝευ ( $13 \pm 3\%$ ), μπορούμε να αναφέρουμε την ύπαρξη ομοιοτήτων στη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών μεταξύ ορνιθίων, χοίρων και επίμυων.

Η ΝακΓαλ αποτελεί βασικό συστατικό των βλεννοπρωτεϊνών και συναντάται εσωτερικά και εξωτερικά στις πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες (Forstner και Forstner, 1994). Η μείωση του ποσοστού της ΝακΓαλ στο λεπτό έντερο ορνιθίων 42 ημερών, μπορεί να υποδηλώνει τη μείωση του αριθμού των πλευρικών αλυσίδων των βλεννοπρωτεϊνών ή τη μείωση του αριθμού των αλυσίδων με τελικό μονοσακχαρίτη τη ΝακΓαλ. Η βοήθεια ιστοχημικών αναλύσεων και η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας του ειλεού θα μπορέσει να μας δώσει περισσότερες πληροφορίες για τις διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της ΝακΓαλ.

Επιπροσθέτως, η μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών επηρεάστηκε από το τμήμα του εντέρου που εξετάστηκε. Πιο συγκεκριμένα, οι βλεννοπρωτεΐνες του ειλεού έχουν χαμηλότερη μοριακή αναλογία ΝακΓαλ και υψηλότερη μοριακή αναλογία Γαλ σε σύγκριση με τις βλεννοπρωτεΐνες του δωδεκαδακτύλου. Με τη βακτηριακή δραστηριότητα να εντοπίζεται κυρίως στον πρόλοβο, τον ειλέο και το τυφλό έντερο



(Gabriel et al., 2006), οι παραπάνω αλλαγές μπορεί να οφείλονται στην επίδραση της εντερικής μικροχλωρίδας στη γλυκοσυλίωση (Gheri Bryk et al., 1999; Freitas et al., 2005), στην αποδόμηση (Hoskins et al., 1985; Ruseler-Van Embden et al., 1989; Ruseler-Van Embden et al., 1995; Ruas-Madiedo et al., 2008) και τη γονιδιακή έκφραση (Mack et al., 1999 και 2003) των βλεννοπρωτεϊνών.

Πίνακας 4.3.1. Θνησιμότητα και Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας (EPEF) κατά τη συνολική διάρκεια του πειράματος (1-42 ημέρες).

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>5</sup>	Σημαντικότητα <sup>6,7</sup>	
	C	E1	E2	E3	A		<i>P</i> <sub>linear</sub>	<i>P</i> <sub>quadratic</sub>
Θνησιμότητα	4,76	3,81	4,76	6,67	6,67	2,694	ΜΣ	ΜΣ
ΕΔΠ <sup>4</sup>	295 <sup>ab</sup>	287 <sup>a</sup>	325 <sup>c</sup>	315 <sup>bc</sup>	323 <sup>c</sup>	9,8	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη μείγματος αιθερίων ελαίων (ΜΑΕ) ή αντιβιοτικού, E1=ΒΣ με προσθήκη 80 g ΜΑΕ/kg τροφής, E2= ΒΣ με προσθήκη 125 g ΜΑΕ/kg τροφής, E3= ΒΣ με προσθήκη 250 g ΜΑΕ/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 επαναλήψεις (κλωβούς) ανά επέμβαση. Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) στην ίδια σειρά διαφέρουν σημαντικά με  $P \leq 0,05$ .

<sup>3</sup> Η θνησιμότητα εκφράζεται σε ποσοστό (%), ενώ ο Ευρωπαϊκός Δείκτης Παραγωγικότητας (EPEF) είναι καθαρός αριθμός.

<sup>4</sup>ΕΠΔ= ΣΒ (kg) × Βιωσιμότητα (%) × 100 / Ηλικία (ημέρες) × ΣΕΤ.

<sup>5</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>6</sup> \*=  $P \leq 0,05$ , \*\*=  $P \leq 0,01$ , \*\*\*=  $P \leq 0,001$ , ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>7</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του ΜΑΕ στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, E1, E2 και E3.

Πίνακας 4.3.2. Ολική συγκέντρωση (µg/ml διαλύματος βλεννινών) των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών

	Επέμβαση <sup>1</sup>					SEM <sup>3</sup>	Σημαντικότητα <sup>4,5</sup>	
	C	E1	E2	E3	A		<i>P</i> <sub>linear</sub>	<i>P</i> <sub>quadratic</sub>
14 μέρες <sup>2</sup>								
Δωδεκαδάκτυλος	33,9	38,9	42,7	34,6	38,5	7,14	ΜΣ	ΜΣ
Ειλεός	31,6	41,0	25,0	30,0	29,1	7,20	ΜΣ	ΜΣ
42 μέρες								
Δωδεκαδάκτυλος	34,2	23,9	23,6	25,0	26,1	5,50	ΜΣ	ΜΣ
Ειλεός	40,6	36,3	36,1	37,6	30,6	9,67	ΜΣ	ΜΣ
Τυφλό έντερο	73,2	54,2	65,1	70,9	60,9	15,65	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Επεμβάσεις: C=Βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) χωρίς προσθήκη μείγματος αιθερίων ελαίων (ΜΑΕ) ή αντιβιοτικού, E1=ΒΣ με προσθήκη 80 g ΜΑΕ/kg τροφής, E2= ΒΣ με προσθήκη 125 g ΜΑΕ/kg τροφής, E3= ΒΣ με προσθήκη 250 g ΜΑΕ/kg τροφής, A= ΒΣ με προσθήκη 2.5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής.

<sup>2</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 6 επαναλήψεις (ορνίθια) ανά επέμβαση.

<sup>3</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>4</sup> ΜΣ= Μη σημαντική.

<sup>5</sup>Η γραμμική και τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του ΜΑΕ στο βασικό σιτηρέσιο εξετάστηκε με τη βοήθεια των πολυωνυμικών αντιθέσεων χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, E1, E2 και E3.

Πίνακας 4.3.3. Επίδραση της ηλικίας και του τμήματος του εντέρου στην συγκέντρωση και την μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των βλεννοπρωτεϊνών στο λεπτό έντερο ορνιθίων κρεοπαραγωγής

	Ηλικία		Τμήμα		SEM <sup>4</sup>	Σημαντικότητα <sup>5</sup>		
	14 μέρες	42 μέρες	Δωδ/λος	Ειλεός		Ηλικία	Τμήμα	Ηλικία X Τμήμα
Συγκέντρωση <sup>1</sup>	32,8	37,4	34,1	36,1	4,88	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Μονοσακχαρίτες <sup>2</sup>								
N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη	35,0	33,9	34,6	34,4	1,21	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη	11,3	9,9	11,5	9,6	0,44	*	**	ΜΣ
Γαλακτόζη	25,8	25,6	23,6	27,8	0,67	ΜΣ	***	ΜΣ
Μαννόζη	3,7	3,3	4,0	3,0	0,29	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Φουκόζη	5,6	12,1	9,0	8,7	0,72	***	ΜΣ	ΜΣ
N-ακετυλ-νευραμινικό οξύ	18,6	15,1	17,3	16,4	1,67	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

<sup>1</sup>Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών εκφράστηκε σε µg/ml.

<sup>2</sup>Η μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό (%).

<sup>3</sup>Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 6 επαναλήψεις (ορνίθια) από την επέμβαση του μάρτυρα (επέμβαση C).

<sup>4</sup>Συνολικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

<sup>5</sup> \*= $P \leq 0,05$ , \*\*= $P \leq 0,01$ , \*\*\*= $P \leq 0,001$ , ΜΣ= Μη σημαντική.

## Ε. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Τα αντιβιοτικά αποτελούν αναμφισβήτητα μια από τις σημαντικότερες επιστημονικές ανακαλύψεις του 20<sup>ου</sup> αιώνα και χρησιμοποιούνται στο τομέα της πτηνοτροφίας από τη δεκαετία του '50. Από τότε, η παραγωγή τροφίμων ζωικής προέλευσης έχει αυξηθεί σημαντικά, με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων και της πυκνότητας των ζώων εκτροφής, με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη ανάγκη για διαχείριση (πρόληψη και αντιμετώπιση) διαφόρων ασθενειών (Mathew et al., 2007). Η παγκόσμια τάση για μείωση της χρήσης αντιβιοτικών φαρμάκων και η απαγόρευση της χρησιμοποίησης τους από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε μη θεραπευτικές δόσεις, λόγω των αρνητικών συνεπειών τους σε ανθρώπους και ζώα, οδήγησε στην εύρεση εναλλακτικών πρόσθετων διατροφής με δράση αυξητικών παραγόντων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρείχαν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη συμπληρωματική χορήγηση δύο διαφορετικών, ως προς το μηχανισμό δράσης, πρόσθετων υλών στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής και την αποτελεσματικότητά τους ως αυξητικών παραγόντων.

Το μίγμα προβιοτικών μικροοργανισμών και το μίγμα των αιθερίων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία βελτίωσε τις αποδόσεις των ορνιθίων και κατ' επέκταση την παραγωγικότητα της εκμετάλλευσης, στα επίπεδα της συμπληρωματικής χορήγησης αβιλαμυκίνης, ένα αντιβιοτικό με αρκετές αναφορές στα σιτηρέσια ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Aarestrup et al., 2000). Σε προηγούμενο πείραμα, που χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πολυστέλεχο ΠΣ, παρατηρήθηκε βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης και του ΣΕΤ, ύστερα από προσθήκη  $2 \times 10^8$  μικροοργανισμών ανά πτηνό, ενώ οι αποδόσεις ήταν ίδιες με την επέμβαση του αντιβιοτικού (Mountzouris et al., 2007). Θετική επίδραση στο ΣΒ ορνιθίων 21 και 42 ημερών παρατηρήθηκε, επίσης, όταν χορηγήθηκε το ίδιο ΠΣ στο νερό σε συνδυασμό με την προσθήκη στην τροφή ενός μίγματος που περιελάμβανε το προβιοτικό *Enterococcus faecium*, φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες και κυτταρικά τοιχώματα (Peric et al., 2010). Αντίθετα, στατιστικές διαφορές δεν παρουσιάστηκαν στο ΣΒ και το ΣΕΤ ύστερα από προσθήκη του συγκεκριμένου ΠΣ, στην τροφή ή την τροφή και το νερό (Eckert et al., 2010). Όσον αφορά το ΜΑΕ, παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα εργασία, δηλαδή σημαντική

βελτίωση του ΣΕΤ και αριθμητική βελτίωση του ΣΒ ορνιθίων Cobb 500 σαράντα ημερών, εμφανίστηκαν ύστερα από την προσθήκη 125 mg/ kg τροφής του ίδιου ΜΑΕ (Eckert et al., 2010). Επίσης, η προσθήκη 125 mg PEP/ kg τροφής, αύξησε σημαντικά το ΣΒ και βελτίωσε (αριθμητικά) την τιμή του ΣΕΤ σε σχέση με το μάρτυρα, σε 42 ημερών ορνίθια Cobb 500 (Peric et al., 2010). Η επαναληψιμότητα της θετικής επίδρασης των δύο υπό εξέταση προσθέτων υλών στις αποδόσεις των ζώων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα πρόσθετα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση των αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων, και ειδικά της αβιλαμυκίνης.

Εκτός όμως από την επιλογή των επιμέρους συστατικών που απαρτίζουν μια πρόσθετη ύλη, εξίσου σημαντικό είναι το επίπεδο προσθήκης της. Το γεγονός ότι η βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών δεν ήταν ανάλογη με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης ΠΣ ή ΜΑΕ, τονίζει τη σημαντικότητα της διερεύνησης της δόσης της συμπληρωματικής χορήγησης ενός προσθέτου για την αποτελεσματικότητα της δράσης του. Τα ευρήματα της παρούσης εργασίας έρχονται να προστεθούν σε ένα σημαντικό αριθμό μελετών που αναφέρουν ότι η αύξηση του επιπέδου προσθήκης ενός ΠΣ (Apata, 2008; Li et al., 2008; Huang et al., 2004) ή ενός ΜΑΕ (Ciftci et al., 2005; Zhang et al., 2005; Soltan et al., 2008) δεν έχει πάντα ευνοϊκές επιδράσεις στην ανάπτυξη των πτηνών.

Η ανίχνευση των μονοσακχαριτών που απαρτίζουν τις πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής με τις αναλυτικές τεχνικές HPLC, εφαρμόζεται για πρώτη φορά, γι' αυτό και δεν υπάρχουν παρόμοιες εργασίες προς σύγκριση. Ο Anumula, κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ανίχνευσε τα μονομερή ανοσοσφαιρίνης G και φετουίνης (fetuin) βοοειδών. Στα ορνίθια έως τώρα, τα μονομερή των βλεννοπρωτεϊνών ανιχνεύονταν κυρίως με ιστοχημικές αναλύσεις και τη βοήθεια των λεκτινών (Sharma και Schumacher, 1997; Bryk et al., 1999; Fernandez et al., 2000). Η χρησιμοποίηση των λεκτινών βασιζόταν στην ιδιότητά τους να δεσμεύουν συγκεκριμένους μονοσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι λεκτίνες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν μόνο τους τερματικούς μονοσακχαρίτες μιας αλυσίδας και όχι τους εσωτερικούς. Επίσης, η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας έχει δώσει αρκετές πληροφορίες σχετικά με το επίπεδο των υδατανθράκων στις βλεννοπρωτεΐνες επίμυων, χοιριδίων και βοοειδών (Shub et al., 1983; Turck et al., 1993; Montagne et al., 2000). Η

επαναληψιμότητα των μετρήσεων και για τα δύο πειράματα, σε συνδυασμό με τα παρεμφερή αποτελέσματα για χοίρους και επίμυες (οι εξοζαμίνες ΝακΓлк και ΝακΓαλ απαρτίζουν την κυρίαρχη ομάδα με ποσοστό >50% και στα τρία είδη ζώων), αποτελούν στοιχείο για την εγκυρότητα της μεθόδου.

Τα αποτελέσματα της μοριακής αναλογίας των μονοσακχαριτών στα δύο πειράματα δίνουν μια σημαντική πληροφορία αναφορικά με το τμήμα του εντέρου που παρατηρήθηκε τροποποίηση της βιοχημικής σύστασης των βλεννοπρωτεϊνών. Στο πείραμα Α, σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων παρουσιάστηκαν στο τυφλό έντερο των ορνιθίων, ενώ καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο λεπτό έντερο. Έχει αποδειχθεί ότι η συμπληρωματική χορήγηση προβιοτικών μικροοργανισμών μέσω της τροφής ή του νερού έχει τη δυνατότητα να τροποποιήσει τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας στο τυφλό έντερο, αυξάνοντας τον πληθυσμό βακτηρίων του είδους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* και των προϊόντων μεταβολισμού τους (Mountzouris et al., 2007 και 2010). Αντίθετα, το επίπεδο προσθήκης του ΜΑΕ φαίνεται ότι επηρέασε περισσότερο τη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών στον ειλεό ορνιθίων κυρίως 14 αλλά και 42 ημερών. Σύμφωνα με τον Kohler (2000), τα ενεργά συστατικά των αιθερίων ελαίων απορροφώνται από το λεπτό έντερο και είτε εξουδετερώνονται στους νεφρούς είτε αποβάλλονται ως CO<sub>2</sub>, ενώ ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής τους αποτρέπει τη συσσώρευσή τους στους ιστούς. Είναι χαρακτηριστικό ότι κανένα προϊόν μεταβολισμού δεν εμφανίστηκε στα ούρα επίμυων ύστερα από τη διατροφική χορήγηση καρβακρόλης και θυμόλης σε συγκέντρωση 1 mmol/ kg σωματικού βάρους (Austgulen et al., 1987). Η επίδραση του κάθε πρόσθετου στη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών στο αντίστοιχο εντερικό τμήμα ενισχύει την ανάγκη για περισσότερη έρευνα όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών και των αιθερίων ελαίων.

Όσον αφορά το τυφλό έντερο, οι συγκεντρώσεις των πληθυσμών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* των ορνιθίων 42 ημερών αυξήθηκαν γραμμικά με την αύξηση του επιπέδου συμπληρωματικής χορήγησης του ΠΣ (Mountzouris et al., 2010) ή του ΜΑΕ (Mountzouris et al., 2011). Παρόλα αυτά, μόνο η αύξηση του επιπέδου προσθήκης του ΠΣ επηρέασε τη βιοχημική σύσταση των βλεννινών. Όπως έχει αναφερθεί, η ενδογενής μικροχλωρίδα μπορεί να επηρεάσει τη μοριακή αναλογία των μονομερών (Salysers, 1979; Hoskins et al., 1985; Ruas-Madiedo et al., 2008; Scwad και Gänzle, 2011; Stahl et al., 2011; Kirjavainen et al., 1998; Gusils et al., 2003; Bry et al., 1996; Gheri Bryk et al., 1999; Freitas et al., 2005; Mack et al., 1999 και 2003). Η συγκεκριμένη αναλυτική

τεχνική που χρησιμοποιήθηκε μελέτησε τη σύσταση της μικροχλωρίδας σε επίπεδο πληθυσμού. Η εξέταση της μικροχλωρίδας σε επίπεδο στελέχους ή η αύξηση του επιπέδου προσθήκης MAE μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το λόγο αυτής της διαφοροποίησης.

Ένα αποτέλεσμα που χρίζει ιδιαίτερης προσοχής, είναι η επίδραση του επιπέδου προσθήκης ΠΣ ή MAE στη μοριακή αναλογία της Man στο δωδεκαδάκτυλο και τον ειλέο των ορνιθίων 14 ημερών, ενώ η επίδραση δεν εμφανίζεται στα ορνίθια 42 ημερών. Η ποσότητα της Man στις βλεννίνες είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της ενεργότητας των ολιγοσακχαρυλ-τρανφερασών, που καταλύουν την προσκόλληση ολιγοσακχαριτών πλούσιων σε Man στην ασπαραγίνη, της ενεργότητας της μαννοσιδάσης και της γονιδιακής έκφρασης των βλεννινών (Hoskins et al., 1985; Forstner και Forstner, 1994). Είναι πιθανό η επίδραση της διατροφής στην N-γλυκοσυλίωση να εξαρτάται από την ηλικία, σε ένα γενικότερο πλαίσιο που αφορά την ανάπτυξη και την ωρίμανση του γαστρεντερικού συστήματος νεαρών ορνιθίων που ως γνωστό δεν θεωρείται ολοκληρωμένο τις πρώτες 10 ημέρες από την εκκόλαψη (Batal και Parsons, 2002).

Παρόλο που έχει αναφερθεί ότι θεραπευτικές δόσεις αντιβιοτικών προκαλούν μερική διάσπαση των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών (Carlstedt-Duke et al., 1986), η αβιλαμυκίνη αυξάνει τη γονιδιακή έκφραση (Smirnov et al., 2005) και η ψευδαργυρική βακιτρασίνη αυξάνει τη συγκέντρωση των σουλφο-βλεννινών, η βιοχημική σύσταση των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών των πτηνών δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg ΒΣ και στα δύο πειράματα.

Το επίπεδο προσθήκης ΠΣ ή MAE δεν επηρέασε την εντερική μορφολογία των ορνιθίων 14 ημερών. Αντίθετα, στα ορνίθια 42 ημερών, το επίπεδο προσθήκης ΠΣ αύξησε γραμμικά το ΥΛ και το ΒΚ στο τυφλό έντερο, ενώ το επίπεδο προσθήκης MAE αύξησε το ΥΛ στον ειλέο. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με την επίδραση των προσθέτων στη σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών των αντίστοιχων τμημάτων και εμπλέκονται στην επίδραση των προσθέτων στους φυσιολογικούς μηχανισμούς του γαστρεντερικού συστήματος των πτηνών.

Ένας από τους πιο σημαντικούς φυσιολογικούς ρόλους του γλυκοκάλυκα είναι η προστασία του εντερικού επιθηλίου από το περιεχόμενο του εντερικού αυλού. Η αύξηση της έντασης χρώσης από τη βάση των λαχνών προς την κορυφή, δηλαδή του



τιμήματος που δέχεται τη μεγαλύτερη επιρροή από τα συστατικά του αυλού, και για τα 2 πειράματα, επιβεβαιώνει τον προστατευτικό ρόλο του γλυκοκάλυκα.

Το επίπεδο προσθήκης ΠΣ αύξησε γραμμικά το πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο των ορνιθίων 14 και 42 ημερών, ενώ το πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο των ορνιθίων 42 ημερών αυξήθηκε γραμμικά και από το επίπεδο προσθήκης ΜΑΕ. Αντίθετα, καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στον ειλεό ή στο τυφλό έντερο των ορνιθίων, ανεξαρτήτως ηλικίας και για τα δύο πειράματα. Ως γνωστό, ο γλυκοκάλυκας του δωδεκαδακτύλου αποτελεί την πρώτη γραμμή προστασίας του εντερικού βλεννογόνου από τις έντονες συνθήκες που προκαλούν το όξινο γαστρικό περιεχόμενο, τα παγκρεατικά ένζυμα και τα χολικά άλατα. Η αύξηση του πάχους του γλυκοκάλυκα μπορεί να θεωρηθεί ευεργετική για την προστασία του εντερικού επιθηλίου σε συνδυασμό από το γεγονός ότι η πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών της τροφής δεν επηρεάστηκε αρνητικά σε σχέση με το μάρτυρα, ύστερα από τη συμπληρωματική χορήγηση ΠΣ ή ΜΑΕ στη διατροφή των ορνιθίων.

## ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προσθήκη υποθεραπευτικών δόσεων αντιβιοτικών ουσιών στη διατροφή εκτρεφόμενων ζώων είναι ευρέως διαδεδομένη τα τελευταία 50 χρόνια και αποσκοπεί στη βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών των ζώων και την αύξηση της παραγωγικότητας και της οικονομικότητας μιας κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης. Όμως, η συνεχής χρησιμοποίηση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων και οι συνέπειές τους σε θέματα βιοασφάλειας, όπως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας παθογόνων οργανισμών στα αντιβιοτικά ή συσσώρευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα ζωικά προϊόντα και το περιβάλλον, οδήγησε στη μείωση ή την απαγόρευση χρήσης τους. Η αντικατάστασή τους από εναλλακτικούς αυξητικούς παράγοντες κρίθηκε αναγκαία για τη ραγδαία εξελίξιμη σύγχρονη κτηνοτροφία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας απέδειξαν ότι προβιοτικοί μικροοργανισμοί της εντερικής μικροχλωρίδας υγιών πτηνών και τα ενεργά συστατικά φυτικών εκχυλισμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές πηγές αυξητικών παραγόντων στην πτηνοτροφία, καθώς παρουσιάζουν συγκρίσιμα αποτελέσματα στις αποδόσεις των ζώων με τη χρήση ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων. Όμως για την αποτελεσματικότερη εφαρμογή τους, θεωρείται απαραίτητη η εντατική διερεύνηση για το επίπεδο προσθήκης, καθώς η εφαρμογή μη βέλτιστων δόσεων μπορεί να οδηγήσει σε αντίθετα αποτελέσματα, όσον αφορά την παραγωγικότητα των πτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων.

Η χρησιμοποίηση της HPLC για τη διερεύνηση της επίδρασης της διατροφής στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών ορνιθίων κρεοπαραγωγής για πρώτη φορά αποδείχθηκε ένα αποτελεσματικό μέσο ανίχνευσης της σύστασης των πλευρικών υδατανθρακικών αλυσίδων των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του γλυκοκάλκα. Τα επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα στα 2 πειράματα και η συμφωνία τους με τη σύσταση των βλεννινών άλλων ζώων, ενισχύει την αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου.

Η προσθήκη διαφορετικών επιπέδων ΠΣ ή ΜΑΕ, η ηλικία και το τμήμα του εντέρου επηρέασε τη μοριακή αναλογία των δομικών μονάδων των υδατανθρακικών αλυσίδων των εντερικών βλεννοπρωτεϊνών.

Η προσθήκη 3 διαφορετικών επιπέδων ΠΣ διαφοροποίησε τη μορφολογία του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών, ενώ το επίπεδο προσθήκης MAE επηρέασε τη μορφολογία του λεπτού εντέρου των ορνιθίων.

Το επίπεδο προσθήκης ΠΣ επηρέασε το πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 42 ημερών, ενώ το επίπεδο προσθήκης MAE επηρέασε το πάχος του γλυκοκάλυκα στο δωδεκαδάκτυλο ορνιθίων 14 ημερών.

Η προσθήκη ΠΣ, MAE και η ηλικία δεν επηρέασαν την ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα με την μέθοδο Alcian Blue-PAS. Αντίθετα, η ένταση χρώσης επηρεάστηκε από το τμήμα της λάχνης, ενώ περαιτέρω διερεύνηση για την επίδραση του εντερικού τμήματος και του τμήματος της κρύπτης θεωρείται απαραίτητη.

Η προσθήκη της αβιλαμυκίνης στα σιτηρέσια είχε θετική επίδραση στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και τη μορφολογία του εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Αντιθέτως, καμία επίδραση δεν παρουσιάστηκε στη μοριακή αναλογία των μονοσακχαριτών, το πάχος και την ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν τα θετικά αποτελέσματα της συμπληρωματικής χορήγησης πρόσθετων διατροφής στα παραγωγικά χαρακτηριστικά ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με σκοπό την αντικατάσταση των αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων. Το επίπεδο προσθήκης έπαιξε σημαντικό ρόλο στη μορφολογία του εντέρου, στο πάχος του γλυκοκάλυκα και στην τροποποίηση της σύστασης του υδατανθρακικού τμήματος των βλεννοπρωτεϊνών, ενώ η τελευταία επηρεάστηκε σημαντικά από την ηλικία των πτηνών αλλά και το εντερικό τμήμα. Η ένταση χρώσης του γλυκοκάλυκα και κατ' επέκταση η έκκριση των βλεννινών από τα καλυκοειδή κύτταρα δεν επηρεάστηκε από το επίπεδο προσθήκης προβιοτικού σκευάσματος ή μίγματος αιθερίων ελαίων αλλά από το τμήμα της λάχνης, επιβεβαιώνοντας το φυσιολογικό ρόλο της βλέννης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να αποτελέσουν εφαλτήριο για μελλοντική έρευνα. Η διερεύνηση της επίδρασης των μεμονωμένων προβιοτικών μικροοργανισμών του ΠΣ ή των αιθερίων ελαίων του MAE, θα δώσουν απαντήσεις αν ο συνδυασμός ή συγκεκριμένα συστατικά αύξησαν τις αποδόσεις των ζώων ή επηρέασαν τη βιοχημική σύσταση των βλεννοπρωτεϊνών. Όπως έχει προαναφερθεί, οι μονοσακχαρίτες των βλεννοπρωτεϊνών θεωρούνται ως θέσεις προσκόλλησης των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας. Η *in vitro* διερεύνηση της

προσκόλλησης συγκεκριμένων, ωφέλιμων και παθογόνων, βακτηρίων στο έντερο ορνιθίων, αλλά και η *in vivo* διερεύνηση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας σε ορνίθια εμβολιασμένα με στελέχη *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* ή *Eimeria sp.* ύστερα από τη συμπληρωματική χορήγηση των προαναφερθέντων πρόσθετων, μπορεί να αποτελέσουν εφόδιο στο σχεδιασμό διατροφικών στρατηγικών των πτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων, για την πρόληψη ασθενειών του γαστρεντερικού συστήματος και τη μείωση χρησιμοποίησης αντιβιοτικών φαρμάκων ως θεραπευτικό μέσο.

## H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[http://ec.europa.eu/health/antimicrobial\\_resistance/policy/](http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/policy/)

Aarestrup F.M., Bager F., Andersen J. S. (2000). Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers: epidemiological study and changes over time. *Microbial Drug Resistance*, 6: 71-75.

Adibmoradi M. Navidshad B., Seifdavati J., Royan M. (2006). Effect of dietary garlic meal on histological structure of the small intestine in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 43: 378-383.

Allen A., Bell A., Mantle M., Pearson J. P. (1982). The structure and physiology of gastrointestinal mucus. In: Chantler E. N.,(eds). *Mucus in Health and Disease-II*. Plenum Press, New York. USA.

Allen A., Pearson J. P., (1993). Mucus glycoproteins of the normal gastrointestinal tract. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 5: 193–199.

Alroy J., Goyal V., Lukacs W., Taylor R. L., Stout R. G., Ward H. D., Pereira M. E. A., (1989). Glycoconjugates of the intestinal epithelium of the domestic fowl (*Gallus domesticus*): A lectin histochemistry study. *Histochemical Journal*, 21: 187–193.

Ambort D., Johansson M. E., Gustafsson J. K., Nilsson H. E., Ermund A., Johansson B. R., Koeck P. J. B., Hebert H., Hansson G. C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 5645-5650.

Anumula K. R., (1994). Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 220: 275–283.

Anumula K. R., (1995). Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with a sensitive fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 230: 24–30.

AOAC., (1984). Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Official Methods of Analysis, 14th ed., Arlington, VA, USA.

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

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

Arthur C. L., Pawliszyn, J., (1990). Solid phase micro extraction with thermal desorption. *Journal of Analytical Chemistry*, 62: 2145–2148.

Atuma C., Strugala V., Allen A., Holm L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280: 922-929.

Austgulen L. T., Solheim E., Scheline R. R., (1987). Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. *Pharmacology & Toxicology*, 61: 98-102.

AVEC (Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU Countries), Annual Report 2013.

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

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.

Bansil R., Turner B., (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11: 164–170.

Baranyiova E., Holman J. (1976). Morphological changes in the intestinal walls in fed and fasted chickens in 1<sup>st</sup> week after hatching. *Acta Veterinaria Brno*, 45: 151-158.

- Barton M. D., (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13: 279–299.
- Batal A. B., Parsons C. M., (2002). Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. *Poultry Science*, 81: 400–407.
- Bedford M. R., Schulze H. (1995). Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, 53: 145–155.
- Botsoglou N. A., Florou Paneri P., Christaki E., Fletouris D. J., Spais A. B., (2002). Effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 62: 259–265.
- Brenes A., Roura E., (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158: 1–14.
- Bry L., Falk P. G., Midtvedt T., Gordon J. I., (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science*, 273: 1380–1383.
- Bryk S. G., Sgambati E., Gheri G., (1999). Lectin histochemistry of goblet cell sugar residues in the gut of the chick embryo and of the newborn. *Tissue Cell*, 31: 170–175.
- Burrows H., Hurby M., Hung D., Adeola O. (2002). Addition of enzymes to corn-soy diets for ducks: a performance and digestibility study. *Poultry Science*, 81 (suppl. 1): 29.
- Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253.
- Cairnie A. B., Lamerton L. F., Steel G. G., (1965). Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rats. *Experimental Cell Research*, 39: 528–538.
- Carlstedt-Duke B., Høverstad T., Lingaas E., Norin K. E., Saxerholt H., Steinbakk M., Midtvent T., (1986). Influence of antibiotics on intestinal mucin in healthy subjects. *European Journal of Clinical Microbiology*, 5: 634–638.

Chee S. H., Iji P. A., Choct M., Mikkelsen L. L., Kocher A., (2010c). Characterisation and response of intestinal microflora and mucins to manno oligosaccharides and antibiotic supplementation in broiler chickens. *British Poultry Science*, 51: 368–380.

Chee S. H., Iji P. A., Choct M., Mikkelsen L. L., Kocher A., (2010a). Functional interactions of manno-oligosaccharides with dietary threonine in chicken gastrointestinal tract. I. Growth performance and mucin dynamics. *British Poultry Science*, 51: 658–666.

Chee S. H., Iji P. A., Choct M., Mikkelsen L. L., Kocher A., (2010b). Functional interactions of manno-oligosaccharides with dietary threonine in chicken gastrointestinal tract. II. Mucosal development, mucin dynamics and nutrient utilization. *British Poultry Science*, 51: 667–676.

Chesson A. (2000). Non-starch polysaccharides degrading enzymes- types and method of action. In: *Proceedings, Twenty First World's poultry Congress*, Montreal, Canada, August 20-24.

Chichlowski M., Croom J., McBride B. W., Daniel L., Davis G., Koci M. D., (2007). Direct-fed microbial PrimaLac and salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in broiler chicks. *Poultry Science*, 86: 1100-1106.

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

Choct M., Huges R. J., Wang J., Morgan A. J., Annison G. (1995). Feed enzymes eliminate the antinutritive effect by non-starch polysaccharides and modify fermentation in broilers. *Proceedings Australian Poultry Science Symposium*. The University of Sydney, Sydney. 7: 121-125.

Choct M., Hughes R. J., Bedford M. R. (1999). Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *British Poultry Science*, 40: 419-422.

Ciftci M., Guler T., Dalkilic B., Ertas O. N., (2005). The effect of anise oil (*Pimpinella anisum*) on broiler performance. *International Journal of Poultry Sciences*, 4: 851–855.



Classen H. L., Bedford M. R. (1991). The use of enzymes to improve the nutritive value of poultry feeds. Pp 95-116. In: *Recent advances in Animal Nutrition*, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, UK.

Collet S. R. (2004). Controlling gastrointestinal disease to improve absorptive membrane integrity and optimize digestion efficiency. 77-91 In: *Interfacing Immunity, gut health and performance*. Tucker L.A., Taylor-Pickard J. A. (eds) Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Collins M. D., Gibson G. R., (1999). Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches of modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1052S-1057S.

Corfield A. P., Wagner S., Clamp J., Kriaris M., Hoskins L., (1992). Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate *O*-acetyltransferase, *N* acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infection and Immunity*, 60: 3971–3978.

Corfield A. P., Warre B. F. (1996). Mucus glycoprotein and their role in colorectal disease. *Journal of Pathology*, 180: 8-17.

Corfield T. (1993). Overview. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 5: 189-192.

Cross D. E., McDevith R. M., Hillman K., Acamovic, T., (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, digestibilities and gut microflora in chickens 7 to 28 d of age. *British Poultry Science*, 4: 496–506.

Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Shellem T. A., Doerr J. A., (2003). Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. *Poultry Science*, 82: 62–66.

Dalloul R. A., Lillehoj H. S., Tamim N. M., Shellem T. A., Doerr J. A., (2005). Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 28: 351–361.

- Dekker J., Rossen J. W. A., Büller H. A., Einerhand A. W. C. (2002). The MUC family. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27: 126-131.
- Deplancke B., Gaskins H. R. (2001). Microbial modulation of innate defence; goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (suppl): 1131-1141.
- Dharmani P., Srivastava V., Kisson-Singh V., Chadee K. (2008). Role of intestinal mucins in innate host defence mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*, 1: 123-135.
- Doyle M. P., Erickson M. C., (2006). Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*, 85: 960–973.
- Dunn N. (1996). Comparing the pentosans in cereals. *World Poultry*, 12 (1): 25-25.
- EC (European Commission)., (2000). White Paper on Food Safety. COM. (1999)., : 719 final.
- Eckert N. H., Lee J. T., Hyatt D., Stevens S. M., Anderson S., Anderson P. N., Beltran R., Schatzmayr G., Mohnl M., Caldwell D. J. (2010). Influence of probiotic administration by feed or water on growth performance parameters of broiler reared on medicated and nonmedicated diets. *The Journal of Applied Poultry Research*, 19: 59-67.
- Engberg R. M., Hedemann M. S., Steinfeldt S., Jensen B. B. (2004). Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poultry Science*, 83: 925-938.
- EUFIC., (2006). European Food Information Council (EUFIC). The Farm, Beginning the Food Chain. In EUFIC review from farm to fork <http://www.eufic.org/article/en/food-safety-quality/farm-to-fork/rid/farm-to-fork-farm-food-chain/>.
- European Commission, (2001). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. 1-17.
- European Commission, (2003). Regulation 1831 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union L 268/29.

FAO/WHO, (2002). Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 30 April–1 May, London, UK and Ontario, Canada. FAO, Rome, Italy.

Farnell M. B., Donoghue A. M., De Los Santos F. S., Blore P. J., Hargis B. M., Tellez G., Donoghue D. J., (2006). Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poultry Science*, 85: 1900–1906.

Ferket P. R., (1993). Practical use of feed enzymes for turkeys and broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 2: 75-81.

Fernandez F., Sharma R., Hinton M., Bedford M., (2000). Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 1793–1801.

Fischer E. N., Classen H. L. (2000). Age and enzyme related changes in bacterial fermentation in the ileum and caecum of wheat-fed broiler chickens. In: *Proceedings, Twenty First World's poultry Congress*, Montreal, Canada, August 20-24.

Florou Paneri. P., Palatos, G., Govaris A., Botsoglou D., Giannenas I., Ambrosiadis I., (2005). Oregano herb versus oregano essential oil as feed supplements to increase the oxidative stability of turkey meat. *International Journal of Poultry Science*, 4: 866–871.

Forder R. E., Howarth G., Tivey D., Hughes R., (2007). Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poultry Science*, 86: 2396–2403.

Forstner J. F., Forstner G. G., (1994). Gastrointestinal mucus. pp 1255–1284 in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. L. R Johnson, ed. Raven Press, New York, NY.

Freitas M., Axelsson L. G., Cayuela C., Midtvedt T., Trugnan G., (2005). Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. *Histochemistry and Cell Biology*, 124: 423–433.

Freitas M., Axelsson L. g., Cayuela C., Midtvedt T., Truguan G. (2002). Microbial-host interactions specifically control the glycosylation pattern in intestinal mouse mucosa. *Histochemistry and Cell Biology*, 118: 149-161.

Fuller R., (1977). The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, 18: 85-94.

Fuller R., (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365–378.

Fundacion Espanola para el Desarrollo de la Nutricion Animal., (2003). In: de Blas C., Mateos G.G., Rebollar P.G. (Eds.), *Tablas FEDNA de Composicion y Valor Nutritivo de Alimentos Para la Fabricacion de Piensos Compuestos*, 2nd ed. FEDNA, Madrid, Spain.

Gabriel I., Lessire M., Mallet S., Guillot J. F. (2006). Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*, 62: 499-511.

García V., Catalá -Gregori P., Hernández F., Megías M. D., Madrid J., (2007). Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology and meat yield of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 555–562.

Geyra A., Uni Z., Sklan D. (2001). The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *British Journal of Nutrition*, 85: 53-61.

Ghadban G. S., (2002). Probiotics in broiler production—A review. *Archive Fur Geflugelkunde*, 66: 49–58.

Gheri Bryk S., Sgambati E., Gheri G., (1999). Lectin histochemistry of goblet cell sugar residues in the gut of the chick embryo and of the newborn. *Tissue and Cell*, 31: 170–175.

Giannenas I., Florou Paneri P., Papazahariadou M., Christaki E., Botsoglou N. A., Spais A. B., (2003). Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition*, 57: 99–106.

- Gibson G. R., Roberfroid M. B., (1998). Dietary modulation of human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gil De Los Santos J. R., Storch O. B., Gil-Turnes C., (2005). *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella* Enteritidis. *British Poultry Science*, 46: 494–497.
- Govaris A., Botsoglou E., Florou Paneri, P., Moulas A., Papageorgiou, G., (2005). Dietary supplementation of oregano essential oil and -tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during storage. *International Journal of Poultry Science*, 4: 969–975.
- Gracia M., Esteve –Garcia E., Cachaldora P., Marubashi T., McCartney E., Medel P., Van de Aa A. (2009). Efficacité d'un probiotique à base de *Bacillus subtilis* en poulets de chair. *Hiutièmes Journées de la Recherche Avicole*. 1-5.
- Greenwood M. W., Fritts C. A., Waldroup P. W. (2002). Utilization of avizyme 1502 in corn-soybean meal diets with and without antibiotics. *Poultry Science*, 81 (suppl. 1): 25.
- Guan L., Hagen K., Tannock G., Korver D., Fasnko G., Allison G. (2003). Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages using PVR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6750-6757.
- Gum J. R., Hicks J. W., Toribara N. W., Siddiki B., Kim Y. S. (1994). Molecular cloning of human mucin (MUC2) cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 2440-2446.
- Gusils C., Cuozzo S., Sesma F., Gonzalez S. (2002). Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chickens. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 34-42.
- Gusils C., Oppedo O., Pizarro R. González S., (2003). Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 472-478.

Harris H. R. (1900). On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *Journal of Applied Microscopy*, 3: 377-380.

Hernandez F., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias M. D., (2004). Influence of two plant extracts on broiler performance digestibilities and digestive organ size. *Poultry Science*, 83: 169–174.

Higgins S. E., Higgins J. P., Wolfenden A. D., Henderson S. N., Torres-Rodriguez A., Tellez G. and Hargis B., (2008). Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella* Enteritidis in neonatal broiler chicks. *Poultry Science*, 87: 27–31.

Hill F. W., Anderson D. L., (1958). Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *Journal of Nutrition*, 64: 587–603.

Horn N. L., Donkin S. S., Applegate T. J. and Adeola O., (2009). Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and White Pekin ducklings to dietary threonine. *Poultry Science*, 88: 1906–1914.

Hoskins L. C., Agustines M., McKee W. B., Boulding E. T., Kriaris M., Niedermeyer G., (1985). Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *Journal of Clinical Investigation*, 75: 944–953.

Hoskins L. C., Boulding E. T. (1976). Degradation of blood groups antigens in human colonic ecosystems. I. In vitro degradation of ABH blood group-degrading enzymes by enteric bacteria. *The Journal of Clinical investigation*, 57: 63-73.

Hoskins L. C., Boulding E. T., (1981). Mucin degradation in human colon ecosystems: Evidence of the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. *Journal of Clinical Investigation*, 67: 163–172.

Hoskins L. C., Boulding E. T., Gerken T. A., Harouny V. R., Kriaris M. S. (1992). Mucin glycoprotein degradation by mucin oligosaccharide-degrading strains of human faecal bacteria. Characterization of saccharide cleavage products and their potential role

in nutritional support of larger faecal bacterial populations. *Microbial ecology in health and disease*, 5: 193-207.

Hoskins L., (1993). Mucin degradation in the human gastrointestinal tract and its significance to enteric microbial ecology. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 5: 205–213.

Huang M. K., Choi J. L., Houde R., Lee J. W., Lee B. and Zhao X., (2004). Effects of lactobacilli and an acidophilic fungus on the production in Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 51–56.

Imperiali B., O'Connor S. E. (1999). Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 643-649.

Isabel B., Santos Y., (2009). Effects of dietary organic acids and essential oils on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 18: 472–476.

Jamroz D., Wartecki T., Houszka M., Kamel C., (2006). Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90: 255–268.

Jamroz D., Wiliczekiewicz A., Wartecki T., Orda J., Scorupinska J., (2005). Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and domestic grains. *British Poultry Science*, 46: 485–493.

Jin S. H., Corless A., Sell J. L. (1998). Digestive system development in post-hatch poultry. *World's Poultry Science Journal*, 54: 335-345.

Johansson M. E., Larsson J. M. H., Hansson G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (suppl. 1): 4659-4665.

Kabir S. M. L., Rahman M. M., Rahman M. B., Ahmed S. U., (2004). The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 3: 361–364.

Kamel C., (2000). A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix*, 11: 19–21.

Khaksefidi A., Ghoorchi T. (2006). Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. *The Journal of Poultry Science*, 43: 296-300.

Kim Y. S., Ho S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12: 319-330.

Kirjavainen P. V., Ouwehand A., Isolauri E., Salminen S., (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS microbiology Letters*, 167: 185–189.

Kleesen B., Hartmann L., Blaut M. (2003). Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*, 89: 597-606.

Kleessen B., Hartmann L., Blaut M., (2003). Fructan in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*, 89: 597–606.

Koenen M. E., Kramer J., Van Der Hulst R., Heres L., Jeurissen S. H. M., Boersma W. J. A., (2004). Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *British Poultry Journal*, 45: 355–366.

Kohler B. (2000). *Clostridium perfringens* intoxication affects bird performance. *World Poultry*, 16: 57-59.

Koutsos E. A., Arias V. J., (2006). Intestinal ecology: interactions among the gastrointestinal tract, nutrition and the microflora. *Journal of Applied Poultry Research*, 15: 161–173.



- Kralik G., Milakovic Z., Ivankovic S., (2004). Effect of probiotic supplementation on the performance and intestinal microflora of broilers. *Acta Agraria Kaposvariensis*, 8: 23–31.
- Laboisse C., Jarry A., Branka J. E., Merlin D., Bou-Hanna c., Vallette G. (1996). Recent aspects of the regulation of the intestinal mucus secretion. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1996: 259-264.
- Lan Y., (2004). Gastrointestinal health benefits of soy water-soluble carbohydrates in young broiler chickens. Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Langhout D. J., Schutte J. B., Van Leeuwen P., Wiebenga J., Tamminga S. (1999). Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. *British Poultry Science*, 40: 340-347.
- Langhout P. (2000). New additives in broiler chicks. *Feed Mix Special: Alternatives to antibiotics*, 24-27.
- Lee K. W., Everts H., Kappert H. J., Van Der Kuillen J., Gemmens A. G., Frehner, M., Beynen A. C., (2004)c. Growth performance, intestinal viscosity, fat digestibility and plasma cholesterol in broiler chickens fed a rye-containing diet without or with essential oil components. *International Journal of Poultry Science*, 3: 613–618.
- Lee K. W., Ahn Y. J. (1998). Growth-inhibiting effects of cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 8-12.
- Lee K. W., Everts H., Kappert H. J., Wouterse H., Frehner M., Beynen A. C., (2004)b. Cinnamaldehyde but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose induced growth depression in female broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 3: 608–612.
- Lee K. W., Everts H., Beynen A. C., (2004)a. Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science*, 3: 738–752.

- Lee K. W., Kappert H. J., Frehner M., Losa R., Beynen A. C., (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*, 44: 450–457.
- Li L. L., Hou Z. P., Li T. J., Wu G. Y., Huang R. L., Tang Z. R., Yang C. B., Gong J., Yu H., Kong X. F., (2008). Effects of dietary probiotic supplementation on ileal digestibility of nutrients and growth performance in 1- to 42-day-old broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 35–42.
- Libao-Mercado A., De Lange C., (2007). Refined methodology to purify mucins from pig colonic mucosa. *Livestock Science*, 109: 141–144.
- Lien K. A., Sauer W., Fenton M., (1997). Mucin output in ileal digesta of pigs fed a protein-free diet. *Zeitschrift Fur Ernährungswiss*, 36: 182–190.
- Lopez-Bote C. J., Gray, J. I., Gomaa E. A., Flegal C. J., (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science*, 39: 235–240.
- Lowry V. K., Farnell M. B., Ferro P. J., Swaggerty Bahl A., Kogut M. H. (2005). Purified  $\beta$ -glucans as an abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 309–318.
- Lyons T.P. (1993). Biotechnology in feed industry. In: Biotechnology in feed industry. Lyons T.P. Alltech Technical publication. Alltech, Inc. Nicholasville, USA.
- Macfarlane G. T., Gibson G. R., (1991). Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 61: 289–293.
- Mack D. R., Ahrne S., Hyde L., Wei S., Hollingsworth M. A., (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52: 827–833.
- Mack D. R., Michail S., Wie S., McDougall L., Hollingsworth M. A., (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology*, 276: G941–950.

- Mantle M., Husar S. D. (1994). Binding *Yersinia enterocolitica* to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involves interactions with the mucin carbohydrate moiety. *Infection and Immunity*, 62: 1219-1227.
- Marquardt R. R., (1983). A simple spectrophotometric method for the direct determination of uric acid in avian excreta. *Poultry Science*, 62: 2106–2108.
- Mathew A. G., Cissell R., Liamthong S. (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne pathogens and diseases*, 4: 115-133.
- Mcfarlane S., Hopkins M. J., Mcfarlane G. T. (2001). Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity*, 69: 1120-1126.
- McGuskin M. A., Linden S. K., Sutton P., Florin T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 265-278.
- McReynolds J., Waneck C., Byrd J., Genovese K., Duke S., Nisbet D., (2009). Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phytogenic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. *Poultry Science*, 88: 2075–2080.
- Meslin J. C., Fontaine N., Andrieux C. (1999). Variation of mucin distribution in the rat intestine, caecum and colon: effect of the bacterial flora. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 123: 235-239.
- Miles R. D., Butcher G. D., Henry P. R. and Littell R. C., (2006). Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poultry Science*, 85: 476–485.
- Mitsch P., Zitterl-Eglsen K., Kohler B., Gabler C., Losa R., Zimpernick I., (2004). The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in broiler chicks. *Poultry Science*, 83: 669–675.
- Monsan P., Paul F., (1995). Oligosaccharide feed additives. In: Wallace R. J., Chesson A., (Eds) *Biotechnology in animal Feeds and Animal feeding*. VCH, New York, NY. 233-245.

Montagne L., Piel C., Lalles J. P., (2004). Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutrition Reviews*, 62: 105–114.

Montagne L., Pluske J. R. and Hampson D. J., (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108: 95–117.

Montagne L., Toullec R., Lallés P., (2000). Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Dairy Science*, 83: 507–517.

Mountzouris K. C., Balaskas C., Xanthakos I., Tzivinikou A., Fegeros K., (2009). Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. *British Poultry Science*, 50: 467–478.

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

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

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

Noy Y., Sklan D. (1999). Energy utilization in newly hatched chicks. *Poultry Science*, 78: 1750-1756.

Odetallah N. H. (2000). The use of dietary enzymes to alleviate enteric disorders of turkeys. *Ph.D. Thesis*, North Carolina University State, USA.

- Olsen k. N., Henriksen M., Bisgaard M., Nielsen O. L., Christensen H. (2008). Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antoine van Leeuwenhoek*, 94: 423-437.
- Orban J. I., Patterson J. A., Sutton A. L., Richards G. N., (1997). Effect of sucrose thermal caramel, dietary vitamin level and brooding temperature on growth and intestinal bacterial populations in broiler chickens. *Poultry science*, 76: 482-490.
- Ordonez G., Llopis N., Penalver P., (2008). Efficacy of eugenol against a Salmonella enterica serovar Enteritidis experimental infection in commercial layers in production. *Journal of Applied Poultry Research*, 17: 376–382.
- Ouwehand A., Kirjavainen P., Grunlund M., Isolauri E. and Salminen S., (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9: 623–630.
- Patterson J. A., Burkholder K. M., (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82: 627–631.
- Patterson J. A., Orban J. L., Sutton A. L., Richards G. N., (1997). Selective enrichment of bifidobacteria in the intestinal tract of broilers by thermally produced kestoses and effect on broiler performance. *Poultry Science*, 76: 497-500.
- Paulson J. C., Colley K. J., (1989). Glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 17615–17618.
- Pawlik J. R., Fengler A. I., Marquardt R. R. (1990). Improvement of the nutritional value of rye by the partial hydrolysis of the viscous water-soluble pentosans following water-soaking or fungal enzyme treatment. *British Poultry Science*, 31: 525-538.
- Paz H. B., Tisdale A. S., Danjo Y., Spurr-Michaud S. J., Argüeso P., Gipson I. K. (2003). The role of calcium in mucin packaging within goblet cells. *Experimental eye research*, 77: 69-75.
- Penalver P., Huerta B., Borge C., Astorga R., Romero R., Perea R., (2005). Antimicrobial activity of five essential oil against animal origin strains of the

Enterobacteriaceae family. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section C Immunology*, 113: 1–6.

Perez-Vilar J., Hill R. L., (1999). The structure and assembly of secreted mucins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 31751-31754.

Perić L., Milosévić N., Zikić D., Bjedov S., Cvetković D., Markov S., Mohnl M., Steiner T., (2010). Effects of probiotic and phytogenic products on performance, gut morphology and cecal microflora of broiler chickens. *Archives of Animal Breeding*, 53: 350–359.

Piva A., (1998). Non-conventional feed additives. *Journal of Animal feed Science*, 7: 143-154.

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

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

Robertson A. M., McKenzie C. G., Sharfe N., Stubbs L. B. (1993). A glycosulphatase that removes sulphate from mucus glycoprotein. *Biochemistry Journal*, 293: 683-689.

Robertson A. M., Stanley R. A. (1982). In vitro utilization of mucin by *Bacteroides fragilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 325-330.

Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Fernandez-Garcia C., de los Reyes-Gavilan G., Margolles A., (2008). Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains from the human intestinal microbiota. *Applied of Environmental Microbiology*, 74: 1936-1940.

Ruseler-van Embden J. G. H., van der Hel R. and van Lieshout L. M. C., (1989). Degradation of intestinal glycoproteins by *Bacteroides vulgatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 49: 37–41.

Ruseler-van Embden J. G. H., Van Lieshou L. M. C., Gosselink M. J., P. Marteau., (1995). Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *bifidobacterium*

bifidum to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30: 675–680.

Sales J., Janssens G. P. J., (2003). The use of markers to determine energy metabolizability and nutrient digestibility in avian species. *World's Poultry Science Journal*, 59: 314–327.

Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M. C., Cummings J. H., Franck A., Gibson G. R., Isolauri E., Moreau M. C., Roberfroid M., Rowland I., (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80: 147-171.

Salyers A. A., (1979). Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32: 158–163.

Salyers A. A., West S. E. H., Vercelotti J. R., Wilkins T. D. (1977). Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 529-533.

Santin E., Maiorka A., Macari M., Grecco M., Sanchez J., Okada T., Myasaka A., (2001). Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Applied Poultry Research*, 10: 236–244.

Santos A. A. Jr. (2006). Poultry intestinal health through diet formulation and exogenous enzyme supplementation. Ph.D. Thesis. <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/4359>.

Schwab C., Gänzle M., (2011). Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galacto oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*, 315: 141–148.

Scott T. A., Boldaji F. (1997). Comparison of inert markers for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley-based broiler diets with or without enzymes. *Poultry Science*, 76: 594-598.

- Sell J. L., Angel C. R., Piquer F. J., Mallarino E. G., Al-Batshan H. A. (1991). Development patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. *Poultry Science*, 70: 1200-1205.
- Shareef A. M., Al-dabbagh A. S. A. (2009). Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of broiler. *Iraqi Journal of Veterinary Science*, 3: 23-29.
- Sharma R., Schumacher U., (1995). Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Digestive Disease Science*, 40: 2532–2539.
- Sharma R., Fernandez F., Hinton M., Schumacher U., (1997). The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53: 935–942.
- Shub M., Pang K., Swann D., Walker W., (1983). Age-related changes in chemical composition and physical properties of mucus glycoproteins from rat small intestine. *Biochemistry Journal*, 215: 405–411.
- Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., Du Z., (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 296-305.
- Sieo C. C., Abdullah N., Tan W., Ho Y., (2005). Influence of beta-glucanase producing *Lactobacillus* strains on intestinal characteristics and feed passage rate of broiler chickens. *Poultry Science*, 84: 734–741.
- Sklan D. (2001). Development of the digestive tract of poultry. *World's Poultry Science Journal*, 57: 215-428.
- Slomiany b. L., Bilski J., Sarosiek J., Murty V. L. N., Dworkin B., VanHorn K., Zielenski J., Slomiany A. (1987). *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochemical and biophysical research communications*, 144: 307-314.



Slomiany B. L., Meyer K. (1973). Oligosaccharides produced by acetolysis of blood group active (A+ H) sulfated glycoproteins from hog gastric mucin. *Journal of Biological Chemistry*, 248: 2290-2295.

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

Smirnov A., Tako E., Ferket P. R., Uni Z., (2006). Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. *Poultry Science*, 85: 669–673.

Smirnov A., Sklan D., Uni Z., (2004). Mucin dynamics in the chicken intestine are altered by starvation. *Journal of Nutrition*, 134: 736–742.

Smirnova M. G., Guo L., Birchall J. P., Rearsom J. P. (2003). LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cellular Immunology*, 221: 42-49.

Snel J., Harmsen H. J. M., Van der Wielen P. W. J. J. and Williams B. A., (2002). Dietary strategies to influence the gastro-intestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. Pages 37–69 in *Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract*. M. C. Blok, H. A. Vahl, L. De Lange, A.E. Van de Braak, G. Hemke, and M. Hessing, ed. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands.

Soltan M. A., Shewitta R. S., El-Katcha M. I., (2008). Effects of diary anise seeds supplementation on growth performance, immune response, carcass traits and some blood parameters of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 7: 1078–1088.

Spernakova D., Mate D., Rozanska H., Kovac G., (2007). Effects of dietary rosemary extract and  $\alpha$ -tocopherol on the performance of chickens, meat quality, and lipid oxidation in meat storage under chilling conditions. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51: 585-589.

- Spring P., Wenk C., Dawson K. A., Newman K. E. (2000). The effects of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the cecae of Salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*, 79:205-211.
- Stahl M., Friis L. M., Nothaft H., Liu X., Li J., Szymanski C. M. and Stinzi A., (2011). L-Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 7194–7199.
- Stanley R. A., Satyendra P. R., Wilkinson R. K., Robertson A. m. (1986). Degradation of pig gastric and colonic mucins by bacteria isolated from pig colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 1104-1109.
- Strous G. J., Dekker J., (1992). Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 57–92.
- Sun X., McElroy A., Webb J. R. K. E., Sefton A. E., Novak C., (2005). Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poultry Science*, 84: 1294-1302.
- Tekeli A., Kutlu H. R., Celik L., Doran F., (2010). Determination of the effects of Z. Officinale and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 9: 898–906.
- Teo A. Y., Tan H. M., (2007). Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 296–303.
- Theodoropoulos G., Hicks S. J., Corfield A. P., Miller B. G., Kapel C. M. O., Trivizaki M., Balaskas C., Petrakos G., Carrington S. D. (2005). *Trichinella spiralis*: enteric mucin-related response to experimental infection in conventional and SPF pigs. *Experimental Parasitology*, 109: 63-71.
- Thompson K. L., Applegate T. J., (2006). Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poultry Science*, 85: 1535–1540.
- Thompson K. L., Applegate T. J. (2006). Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poultry Science*, 85: 1535-1540.

- Tsai H., Hart C., Rhodes J., (1991). Production of mucin degrading sulphatase and glycosidases by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Letters of Applied Microbiology*, 13: 97–101.
- Tsirtsikos P., Fegeros K., Balaskas C., Kominakis A., Mountzouris K. C. (2012a). Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphometry in broilers. *Poultry Science*, 91: 1860-1868.
- Tsirtsikos P., Fegeros K., Kominakis A., Balaskas C., Mountzouris K. C. (2012b). Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary inclusion level in broilers. *Animal*, 6: 1049-1057.
- Tuohy K. M., Ziemer C. J., Klinder A., Knobel Y., Pool-Zobel B. L., G. R. Gibson. (2002). A human volunteer study to determine the prebiotic effects of lactulose powder on human colonic microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14: 165–173.
- Turck D., Feste A., Lifschitz C., (1993). Age and diet affect the composition of porcine colonic mucins. *Pediatric Research*, 33: 564–567.
- Uni Z., Platin R. and Sklan D., (1998). Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypts and along the villus. *Journal of Comparative Physiology B*, 168: 241–247.
- Uni Z., Noy Y., Sklan D. (1999). Posthatch development of the small intestinal function in the poult. *Poultry Science*, 78 : 215-222.
- Uni Z., Smirnov A., Sklan D. (2003a). Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine : effect of delayed access to feed. *Poultry Science*, 82: 320-327.
- Uni Z., Tako E., Gal-Garber O., Sklan D. (2003b). Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late term embryo. *Poultry Science*, 82: 1747-1754.
- Van den Bogaard A. E., Stobberingh E. E., (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14: 327–335.

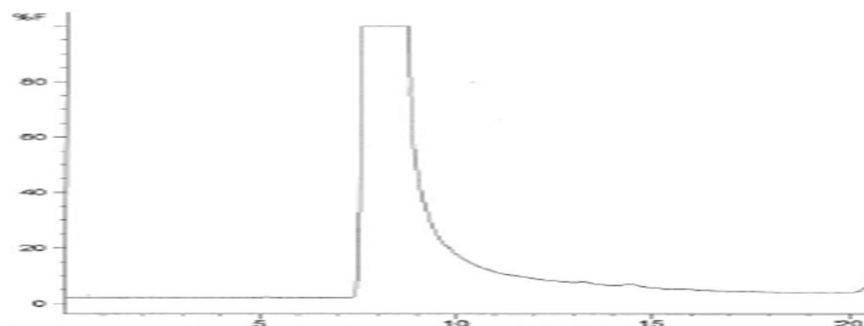
- Van Heerden I. (2009). Evaluation of a phytogetic product from two western herbal medicines to replace an antimicrobial growth promoter in poultry production. *Ph.D. Thesis*. University of Pretoria. USA.
- Vicente J. L., Avina L., Torres-Rodriguez A., Hargis B., Tellez G., (2007). Effect of a *Lactobacillus* spp.-based probiotic culture product on broiler chicks performance under commercial conditions. *International Journal of Poultry Science*, 6: 154–156.
- Vicente J. L., Torres-Rodriguez A., Higgins S. E., Pixley C., Tellez G., Donoghue A. M., Hargis B. M., (2008). Effect of a selected *Lactobacillus* spp.-based probiotic on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis-infected broiler chicks. *Avian Diseases*, 52: 143– 146.
- Vimal D., Khullar M., Gupta S., Ganguly N. (2000). Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 204: 107-117.
- Walker-Nasir E., Ahmad I., Hoessli D. C., Shakoori A. R., Din N. (2003). Mucin glycoproteins. *Proceeding s- Pakistan Academy of Sciences*, 40: 205-232.
- Williams C. H., David D. J. and Iismaa O., (1962). The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Agricultural Sciences*, 59: 381–385.
- Windhorst H.W., (2006). Changes in poultry productionand trade worldwide. *World's Poultry Science Journal*, 62: 585-602.
- Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A., (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86: 140–148.
- Wopereis S., Lefeber D. J., Morava É., Wevers R. A. (2006). Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review. *Clinical chemistry*, 52: 574-600.
- Yu B., Liu J. R., Hsiao F. S. and Chiou P. W. S., (2008). Evaluation of *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain expressing heterologous  $\beta$ -glucanase as a probiotic in poultry diets based on barley. *Animal Feed Science and Technology*, 141: 82–91.

Zhang K.Y., Yan F., Keen C. A., Waldroup P. W., (2005). Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 4: 612–619.

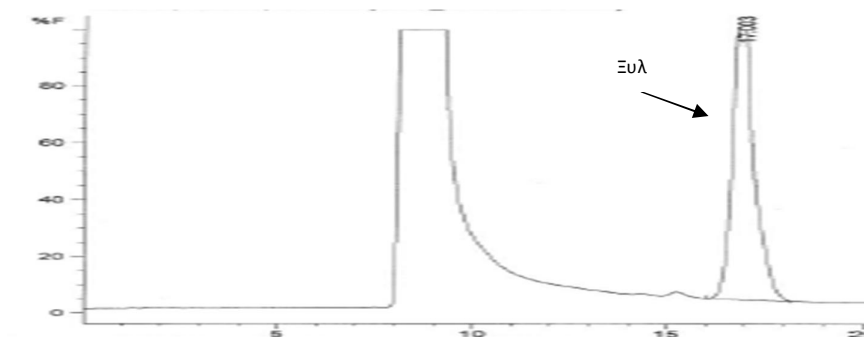
Zulkifli I., Abdullah N., Azrin M. and Ho Y. W., (2000). Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *British Poultry Science*, 41: 593–597.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗΣ, Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΓΑΛΑΚΤΟΖΑΜΙΝΗΣ, ΓΑΛΑΚΤΟΖΗΣ, ΜΑΝΝΟΖΗΣ ΚΑΙ ΦΟΥΚΟΖΗΣ (ΜΕ ΤΗ ΣΕΙΡΑ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ)

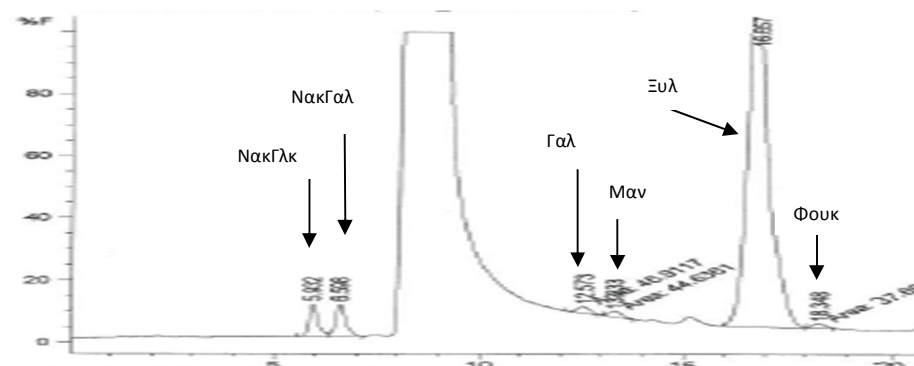
Z.2.1 PBS



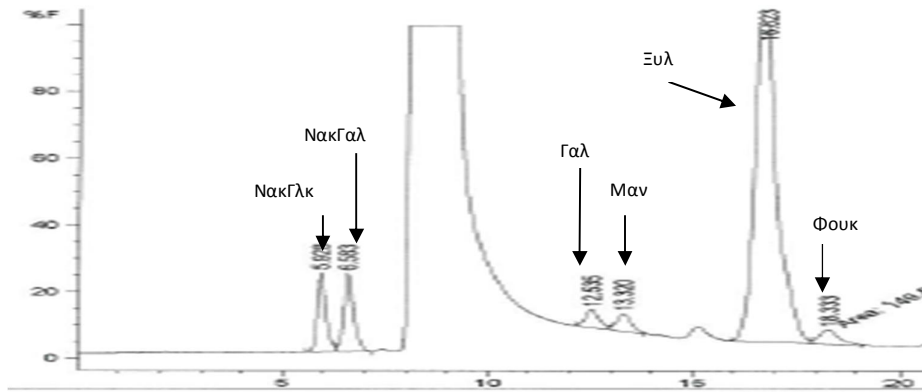
Z.2.2 ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΕΥΛΟΖΗΣ



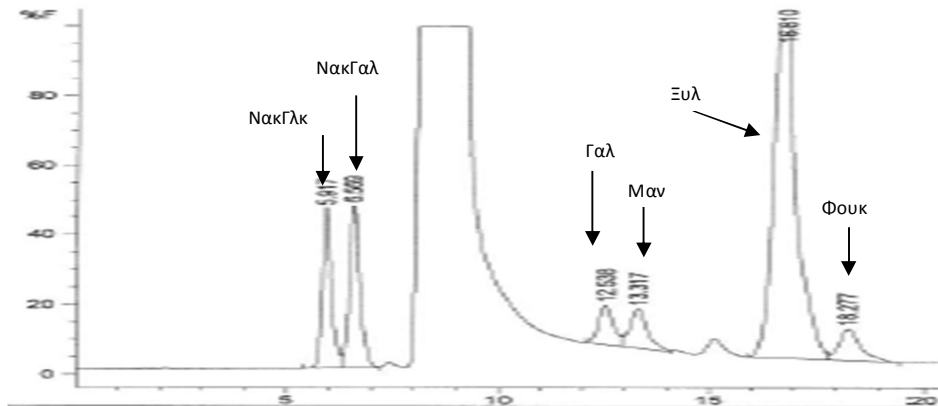
Z.2.2 ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ Χ ΜΕ ΕΥΛΟΖΗ



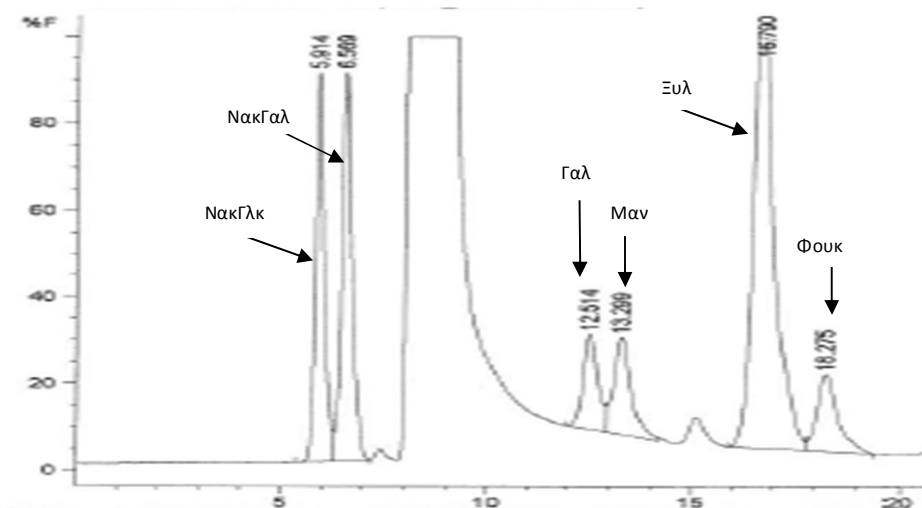
### Z.2.4 ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 2X ΜΕ ΕΥΛΟΖΗ



### Z.2.5 ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 5X ΜΕ ΕΥΛΟΖΗ

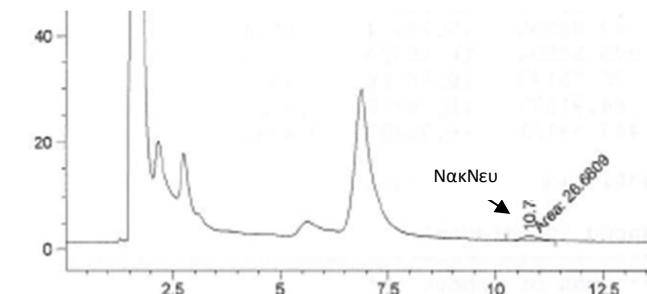


### Z.2.6 ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10X ΜΕ ΕΥΛΟΖΗ

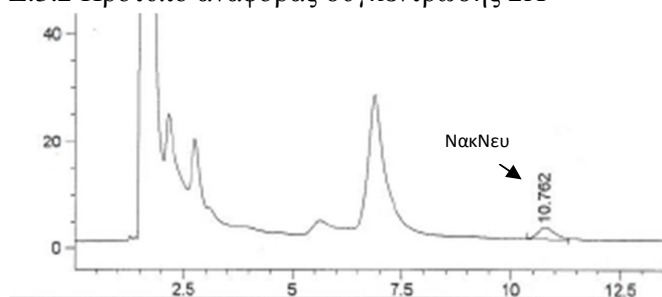


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ Ν-ΑΚΕΤΥΛ-ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

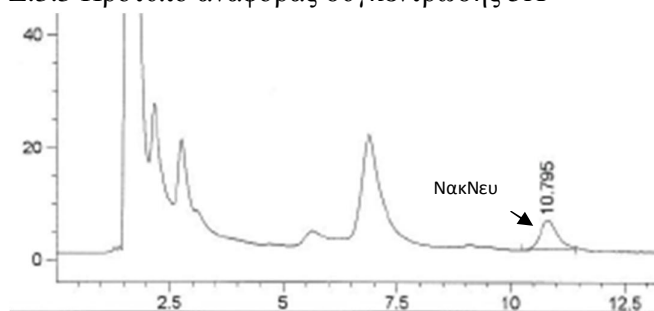
### Z.3.1 Πρότυπο αναφοράς συγκέντρωσης X



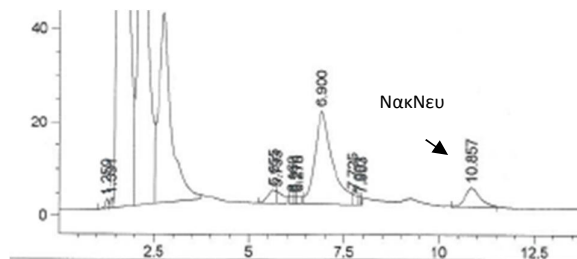
### Z.3.2 Πρότυπο αναφοράς συγκέντρωσης 2X



### Z.3.3 Πρότυπο αναφοράς συγκέντρωσης 5X



### Z.3.4 Δείγμα





ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. ΑΝΑΤΥΠΟ ΑΡΘΡΟΥ: Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Mountzouris K. C., Tsitrsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G., Fegeros K., (2010). *Poultry Science*, 89

**doi: 10.3382/ps.2009-00308**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4. ΑΝΑΤΥΠΟ ΑΡΘΡΟΥ: Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphometry in broilers. Tsirtsikos P., Fegeros K., Balaskas C., Kominakis A., Mountzouris K. C. (2012a). *Poultry Science*, 91

**doi: 10.3382/ps.2011-02005**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5. ΑΝΑΤΥΠΟ ΑΡΘΡΟΥ: Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. Mountzouris K. C., Paraskevas V., Tsirtsikos P., Palamidi I., Steiner T., Schatzmayr G., Fegeros K., (2011). *Animal Feed Science and Technology*, 168

**doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.03.020**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6. ΑΝΑΤΥΠΟ ΑΡΘΡΟΥ: Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary inclusion level in broilers. Tsirtsikos P., Fegeros K., Kominakis A., Balaskas C., Mountzouris K. C. (2012b). *Animal*, 6

**doi: 10.1017/S1751731111002680**