

## NEKATERE PREHRANSKE MOŽNOSTI ZA PREPREČITEV ŠKODLJIVEGA VPLIVA FUZARIJSKIH TOKSINOV (T-2 IN DON) NA PROIZVODNE LASTNOSTI IN LIPIDNO PEROKSIDACIJO PRI PIŠČANCIH

Vida REZAR<sup>a)</sup>, Tamara FRANKIČ<sup>b)</sup> in Janez SALOBIR<sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., e-pošta: [vida.rezar@bfro.uni-lj.si](mailto:vida.rezar@bfro.uni-lj.si).

<sup>b)</sup> Isti naslov kot <sup>a)</sup>, asist., e-pošta: [tamara.frankic@bfro.uni-lj.si](mailto:tamara.frankic@bfro.uni-lj.si).

<sup>c)</sup> Isti naslov kot <sup>a)</sup>, prof., dr., e-pošta: [janez.salobir@bfro.uni-lj.si](mailto:janez.salobir@bfro.uni-lj.si).

Delo je prispelo 24. septembra 2008, sprejeto 15. oktobra 2008.

Received September 24, 2008, accepted October 15, 2008.

### IZVLEČEK

Mikotoksini, sekundarni metaboliti gliv, so strupeni tako za ljudi, kot tudi za živali. Prisotnost fuzarijskih toksinov (T-2 toksina in deoksinivalenola (DON-a)) v krmi, predvsem v višjih koncentracijah, vpliva na zmanjšanje zauživanja krme, posledično pa tudi na prirast živali in zmanjšano težo živali, kar lahko povzroča večje ekonomske izgube. Novejše raziskave so pokazale, da toksini v krmi vplivajo tudi na imunsko odpornost organizma in povzročajo oksidacijski stres oz. povečano lipidno peroksidacijo v organizmu. Namen predstavljenih raziskav je bil ugotoviti vpliv stopnjevanja koncentracije T-2 toksina v krmi (od 0,5 do 13,5 mg/kg) in koncentracije 10 mg/kg T-2 toksina in DON-a na proizvodne lastnosti in oksidacijski stres, pri rastočih piščancih, ter ugotoviti potencialni prehranski vpliv mikotoksinskega vezalca in nukleotidov na zmanjšanje negativnih vplivov fuzarijskih toksinov. Rezultati so pokazali, da koncentraciji 10 in 13,5 mg/kg T-2 toksina vplivata na zmanjšanje zauživanja krme in slabše priraste. Deset in 13,5 mg/kg T-2 toksina in 10 mg/kg DON-a v krmi povzročita poškodbe DNA v levkocitih, merjene s kometnim testom. Rezultati dokazujejo, da lahko z dodajanjem mikotoksinskega vezalca v krmo vsaj delno preprečimo absorpcijo mikotoksinov iz črevesja in tako zmanjšamo njihov negativni vpliv na oksidacijski stres (primerjava med skupinama z in brez dodatka s 13,5 mg T-2 toksina/kg krme), medtem ko z dodajanjem nukleotidov lahko vplivamo na mehanizme popravljanja poškodb DNA imunskih celic, ki so jih povzročili fuzarijski toksini.

Ključne besede: perutnina / pitovni piščanci / prehrana živali / krma / mikotoksini / fuzarijski toksini / lipidna peroksidacija / proizvodne lastnosti

### SOME NUTRITIONAL STRATEGIES IN PREVENTION OF DETRIMENTAL INFLUENCE OF *Fusarium* TOXINS (T-2 AND DON) ON PRODUCTION PARAMETERS AND LIPID PEROXIDATION IN CHICKENS

### ABSTRACT

Mycotoxins, a group of secondary fungal metabolites, are toxic for people and animals. Presence of *Fusarium* toxins (T-2 toxin and deoxinivalenol (DON)) in feed, especially in higher concentrations, reduces feed consumption and consequently live weight gain, which can cause higher economic losses. Recent studies showed that toxins in feed influence the action of the immune system and cause oxidative stress. The objective of the present studies was to: (i) establish the dose dependant effect of T-2 toxin (from 0.5 to 13.5 mg/kg) on production parameters and oxidative stress in broiler chickens, (ii) test the effect of commercial mycotoxin

binder at the highest used concentration of T-2 toxin (13.5 mg/kg), and (iii) test the protective effect of nucleotides at high T-2 toxin and DON intoxication (10 mg/kg). Results showed that concentrations of 10 and 13.5 mg/kg of T-2 toxin reduced the feed consumption and live weight gain. T-2 toxin at 10 and 13.5 mg/kg and DON at 10 mg/kg caused DNA damage in leucocytes measured by comet assay. Results proved that supplementation with mycotoxin binder can partly reduce the absorption of mycotoxins from intestine and thus decrease their negative influence on oxidative stress. The crucial role of nucleotide supplementation in feed is to repair DNA damage in immune cells, which are highly sensitive to mycotoxin action.

Key words: poultry / broiler chickens / animal nutrition / feed / mycotoxins / *Fusarium* toxins / lipid peroxidation / production parameters

## UVOD

V zadnjih desetletjih intenzivnega razvoja živinoreje namenjamo vse večjo pozornost higijenski kakovosti krme in živilom živalskega izvora. Okužbam z mikotoksini se praktično ne moremo izogniti in v svetu predstavljajo zelo velik problem (Wood, 1992; Eriksen in Pettersson, 2004). Mikotoksini, sekundarni metaboliti gliv, so strupeni tako za ljudi, kot tudi za živali. Do danes je poznanih že več kot 300 mikotoksinov, njihovo število pa še kar naprej narašča. Po ocenah strokovnjakov naj bi bilo z mikotoksini okuženega 25 % svetovnega pridelka žit (Fink-Gremmels, 1999). Iz toksikološkega in ekonomskega vidika so za onesnaženje krme najpomembnejši rodovi gliv *Aspergillus*, *Fusarium* in *Penicillium*. V evropskih podnebnih razmerah najpogosteje prihaja do onesnaženja krme, ki ga povzročajo glive iz rodu *Fusarium* in sicer z mikotoksini iz skupine trihotecenov (deoksinivalenol, nivalenol, T-2 toksin) in zearalenonom (ZON) (Dänicke, 2001). S toksikološkega in ekonomskega vidika najpomembnejši mikotoksini so prikazani v pregl. 1.

Preglednica 1. Najpogostejši rodovi gliv in toksini, ki kontaminirajo krmo (Dänicke, 2001)  
Table 1. Frequent mycotoxin producing fungi and their mycotoxins (Dänicke, 2001)

Rod	Mikotoksini
<i>Fusarium</i> -species ( <i>F. gramineum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. moniliforme</i> )	– Zearalenon – Trihoteceni (T-2 toksin, HT-2 toksin, deoksinivalenol (DON), nivalenol...) – Moniliformin – Fumonizini $B_1, B_2, B_3$
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Aflatoksini, posebej Aflatoksin $B_1$
<i>A. alutaceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Ohratoksini, posebej Ohratoksin A
<i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Citrinin
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergot-Alkaloidi
<i>Alternaria alternata</i>	Tenuazonična kislina

Mikotoksine v krmi je v praktičnih razmerah zelo težko odkriti in nadzorovati. Koncentracije mikotoksinov v krmi so običajno dovolj nizke, tako da ne povzročajo kliničnih znakov zastrupitev pri živalih, vseeno pa zmanjšujejo učinkovitost priraje, povečujejo možnost pojavnosti kužnih bolezni (Surai, 2002) in s tem povzročajo veliko gospodarsko in ekonomsko škodo.

Prisotnost fuzarijskih toksinov (T-2 toksina in DON-a) v krmi je škodljiva tako za perutnino kot tudi za prašiče, predvsem v višjih koncentracijah, kar so pokazale tudi naše raziskave (Frankič in sod., 2006, Frankič in sod., 2008). Značilni učinki prisotnosti trihotecenov v krmi perutnine so izguba apetita in odklanjanje krme, rane na koži in sluznicah, slabše operjanje,

poškodbe jeter in ledvic, živčne motnje, pešanje imunskega sistema, nekroze v prebavnem traktu, nižja relativna masa nekaterih organov (želodca, F. burse...), anemija in pogin (Lesson in sod., 1995; Raju in Devegowda, 2000; Garcia in sod., 2003). Opazne so tudi spremembe na kljunu in manjša nesnost (Veldman, 2004).

Pri delovanju mikotoksinov prihaja v celicah do številnih biokemičnih sprememb. Trihoteceni so najbolj toksični za hitro deleče se celice imunskega sistema, jeter in črevesja. Na celični ravni stimulirajo nastajanje prostih radikalov in posledično povzročajo poškodbe na celičnih membranah in DNA. Poleg tega, da toksini inhibitorno vplivajo na sintezo beljakovin v telesu, nekateri znanstveniki trdijo, da je zelo pomemben mehanizem delovanja tudi reakcija lipidne peroksidacije (Surai, 2002), pri kateri se sproščajo prosti radikali in nastajajo toksični produkti npr. malondialdehid (MDA). Ravnotežje med prooksidanti in antioksidanti v celotnem telesu in še posebej v celici, je pomembno za regulacijo številnih metabolnih poti, ki vzdržujejo imunski sistem, nadzirajo rast in razvoj ter ščitijo pred stresnimi dejavniki, značilnimi za sodobno komercialno rejo perutnine (Surai in Dvorska, 2005).

Zaradi vseh naštetih težav in posledic, ki jih povzročajo mikotoksini, je izredno pomembno zagotavljanje krme z majhno vsebnostjo mikotoksinov. Najboljša rešitev, v primeru za živali onesnažene krme z mikotoksini, so učinkoviti prehranski dodatki, ki detoksicirajo krmo, med pasajo skozi prebavni trakt (Pasteiner, 1997) in tako preprečijo ali vsaj omilijo njihovo škodljivo delovanje. Ti prehranski dodatki delujejo večinoma po principu absorpcije toksinov na druge molekule, nekateri pa vsebujejo tudi encime, ki cepijo kemijske vezi v molekulah toksinov do neškodljivih produktov (Dänicke, 2001).

Mikotoksinski vezalec, ki smo ga uporabili v raziskavi, je vseboval vezalce (sintetične polimere-polivinilpolipirolidone) in encime. Na hidratizirane polimere se vežejo mikotoksini, ki imajo polarne funkcionalne skupine. Mikotoksinski vezalec deluje kot adsorbent, ki selektivno veže in imobilizira mikotoksine v prebavnem traktu živali (vezava se začne v ustih in se nadaljuje v želodcu in črevesju). Dodatno encimi razgrajujejo epoksidni obroč fuzarijskih mikotoksinov in jih tako deaktivirajo. Nukleotidi so pogojno esencialno hranilo, ki lahko postane esencialno v primeru bolezenskih stanj, ki zahtevajo večjo sintezo nukleinskih kislin in beljakovin za pospešeno rast in obnovo nekaterih tkiv: sluznice prebavnega trakta (Holen in Jansson, 2004), celic imunskega sistema (Cameron in sod., 2001) ter jetrnega in možganskega tkiva (Perez in sod., 2004).

Namen predstavljenih raziskav je bil ugotoviti vpliv stopnjevanja koncentracije T-2 toksina in koncentracije 10 mg/kg T-2 toksina in deoksinivalenola (DON) na oksidacijski stres, poškodbe DNA imunskih celic in poškodbe jeter pri rastočih piščancih (Ross 308) ter ugotoviti potencialni prehranski vpliv mikotoksinskega vezalca in nukleotidov na zmanjšanje negativnih posledic, ki jih povzročajo toksini.

## MATERIAL IN METODE DELA

Dvaindvajset oz. dvajset dni stare komercialne pitovne linijske križance (Ross 308) smo uhlevili v individualne kletke. Krmo in vodo so imele živali na voljo. Krmljene so bile s krmno mešanico, ki je temeljila na koruzi in sojinah tropinah (pregl. 2). Krma je bila sestavljena glede na potrebe živali v starosti od 3 do 6 tednov (NRC, 1994). Za izvajanje poskusa smo pridobili dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije.

V prvem poskusu smo na začetku poskusa živali razdelili v 6 skupin (10 živali na skupino), ki smo jih krmili z osnovno krmo z različnimi koncentracijami T-2 toksina: Kont (0,0 mg T-2), T-0,5 (0,5 mg T-2/kg krme), T-1,5 (1,5 mg T-2/kg krme), T-4,5 (4,5 mg T-2/kg krme), T-13,5 (13,5 mg T-2/kg krme) in T-13,5+ (13,5 mg T-2/kg krme + 1,5 g/kg krme mikotoksinskega vezalca). V drugem poskusu smo živali razdelili v 5 poskusnih skupin (10 živali na skupino), ki

smo jih krmili z osnovno krmo in dodatkom T-2 toksina in DON-a, glede na skupino: Kont (osnovna krma brez dodatkov), DON (10 mg DON/kg krme, DON+ (10 mg DON/kg krme + 2 g nukleotidov/kg krme, T-2 (10 mg T-2 toksina/kg krme, T-2+ (10 mg T-2 toksina/kg krme + 2 g nukleotidov/kg krme).

Kot vir T-2 toksina in DON-a smo uporabili kontaminirano pšenico avstrijskega proizvajalca Biopure, ki je vsebovala 0,49 % (w/w) T-2 toksina in 1,04 % DON-a (w/w) na kg pšenice. Mikotoksinski vezalec in nukleotide, smo uporabili z namenom deaktivacije mikotoksinov v kontaminirani krmi. Dodatka sta bila uporabljena v koncentracijah priporočenih s strani proizvajalca.

Preglednica 2. Sestava osnovne krme  
Table 2. Composition of basic feed mixture

Količina krmila	%	Količina krmila	%
Koruzna	61,10	Apnenec	1,24
Koruzni gluten	6,00	Mono kalcije fosfat	1,59
Sojine tropine	24,03	L-lizin-HCl 78.8 %	0,19
Sončnično olje	4,90	DL-metionin 98 %	0,09
Sol	0,36	Premiks	0,50

Spremljali smo vpliv T-2 toksina in DON-a na proizvodne lastnosti (telesno maso, dnevne priraste in zauživanje krme) in oksidacijski stres. Vpliv na proizvodne lastnosti smo ugotavljali 6., 11. dan poskusa ter ob zakolu (17. dan). Ob koncu poskusa smo živali žrtvovali, odvzeli smo jim vzorce krvi.

Za ugotavljanje oksidacijskega stresa smo določili vsebnost MDA v krvni plazmi, skupni antioksidativni status krvne plazme (TAS) in glutation peroksidazno aktivnost v eritrocitih (GPx). Poškodbe DNA, ki so lahko posledica oksidacijskega stresa ali pa direktnega učinka toksinov, smo merili v levkocitih krvi s kometnim testom.

Za določitev MDA v krvni plazmi smo v osnovi uporabili metodo, kot jo navajajo Wong in sod. (1987), z modifikacijami po Chirico (1994), Fukunaga in sod. (1995). Skupno antioksidativno kapaciteto (TAS) plazme smo izmerili z železo/metmioglobin absorpcijsko Randox metodo (Randox, Crumlin, UK). Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) v eritrocitih smo določili s pomočjo testih kitov Randox (Randox, Crumlin, UK).

Postopek kometnega testa, ki smo ga uporabili, z manjšimi modifikacijami (več slojev agaroze, daljši čas elektroforeze, manjša koncentracija etidijevega bromida) v glavnem sledi postopku po Singh-u in sod. (1988). Izolirane levkocite smo vključili v agarozne gele. Pri pripravi vzorcev smo upoštevali negativno kontrolo (kontrolna skupina) in pozitivno kontrolo (minigele smo pred alkalno celično lizo potopili v raztopino 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sledila je alkalna celična liza, elektroforeza, nevtralizacija in barvanje z etidijevim bromidom (Et-Br), ter ponovno spiranje.

Podatki so bili statistično obdelani s programskim paketom SAS/STAT. Uporabili smo proceduro GLM (General Linear Model) (SAS 8e, 2000; SAS Inc., Cary, NC, USA). Statistično značilno razliko smo ocenili pri  $p < 0.05$ .

## REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati so pokazali, da koncentracija 10 in 13,5 mg/kg T-2 toksina vpliva na zmanjšanje zauživanja krme in slabše priraste (pregl. 3).

Preglednica 3. Telesna masa, zauživanje krme in prirast pri 1) piščancih, krmljenih z različnimi koncentracijami T-2 toksina in mikotoksinskega vezalca ter 2) pri piščancih krmljenih z dodatkom T-2 toksina, DON-a in nukleotidov

Table 3. Body mass, feed consumption, and live weight gain of 1) chickens exposed to different concentrations of T-2 toxin and mycotoxin binder and 2) chickens fed T-2 toxin, DON and nucleotides

	Telesna masa začetek poskusa, g	Telesna masa konec poskusa, g	Zauživanje krme, g/dan	Prirast, g/dan
1) Piščanci krmljeni z dodatkom T-2 toksina in mikotoksinskega vezalca				
Kont	760,6	2207 <sup>a</sup>	145,9 <sup>a</sup>	88,3 <sup>a</sup>
T 0,5	721,7	2181 <sup>a</sup>	146,4 <sup>a</sup>	88,7 <sup>a</sup>
T 1,5	766,2	2160 <sup>a</sup>	141,0 <sup>a</sup>	86,2 <sup>ac</sup>
T 4,5	752,4	2025 <sup>a</sup>	129,9 <sup>b</sup>	77,6 <sup>c</sup>
T 13,5	752,4	1589 <sup>b</sup>	100,9 <sup>c</sup>	51,0 <sup>b</sup>
T 13,5+	764,0	1482 <sup>b</sup>	99,1 <sup>c</sup>	44,5 <sup>b</sup>
p	0,6282	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2) Piščanci krmljeni z dodatkom T-2 toksina, DON-a in nukleotidov				
Kont	746,8	1655 <sup>a</sup>	108,3 <sup>a</sup>	63,6 <sup>a</sup>
DON	739,8	1528 <sup>a</sup>	96,8 <sup>a</sup>	52,6 <sup>a</sup>
DON+	747,8	1510 <sup>a</sup>	98,3 <sup>a</sup>	53,4 <sup>a</sup>
T-2	745,4	1158 <sup>b</sup>	70,7 <sup>b</sup>	33,5 <sup>b</sup>
T-2+	748,9	1242 <sup>b</sup>	71,9 <sup>b</sup>	34,1 <sup>b</sup>
p	0,814	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

<sup>a, b, c</sup> LS- vrednosti, ki so označene z različnimi črkami, se znotraj poskusa statistično značilno razlikujejo;  $p < 0,05$ .

Številne raziskave potrjujejo naše ugotovitve vpliva T-2 toksina na proizvodne lastnosti. Smith in sod. (2000) so ugotovili, da sta značilna simptoma pri živalih, ki zauživajo krmo kontaminirano s toksini iz skupine trihotecenov, zmanjšana konzumacija in slabša rast. Tudi Hoehler in Marquardt (1996) sta v raziskavi na piščancih prišla do podobnih ugotovitev, da je dodatek T-2 toksina v krmo (v koncentracijah 4 in 5 mg/kg krme), v primerjavi s kontrolno skupino, zmanjšal zauživanje krme in negativno vplival na telesno maso živali. DON ima prav tako škodljive vplive na proizvodne lastnosti, vendar, kot kažejo nekatere raziskave, le pri koncentracijah višjih od 12,6 mg/kg krme (Yegani in sod., 2006). Kubena in sod. (1988) so ugotovili, da so se teža živali in prirasti pri piščancih zmanjšali, če je bilo v krmi 16 mg/kg DON-a, medtem ko so v raziskavi Kubena in sod. (1997), ugotovili, da 15 mg DON-a/kg pri piščancih skoraj ni imelo vpliva na telesno maso živali. Tudi naša raziskava kaže, da 10 mg DON-a/kg krme ne zmanjša telesne mase živali in tudi ne zauživanja krme v primerjavi s kontrolno skupino.

Mikotoksinski vezalec uporabljen v naši raziskavi ni izboljšal proizvodnih lastnosti pri piščancih izpostavljenih 13,5 mg T-2 toksina na kilogram krme. Najverjetneje je količina vezalca, uporabljena v poskusu po priporočilih proizvajalca, premajhna, da bi lahko preprečila negativen učinke pri zelo kontaminirani krmi. Dodatek istega mikotoksinskega vezalca je v raziskavi Dānicke in sod. (2003) še dodatno poslabšal priraste in konverzijo krme pri piščancih, ki so zauživali krmo okuženo z DON-om.

Številni avtorji trdijo, da T-2 toksin in DON stimulirata nastanek prostih radikalov in s tem lipidno peroksidacijo (Karppanen in sod., 1989; Rizzo in sod., 1994; Leal in sod., 1999; Vila in

sod., 2002), vendar pa si, kot ugotavlja Surai (2002), ugotovitve raziskav mnogokrat nasprotujejo. V raziskavi Hoehler in Marquardt (1996) ugotavljata, da dodatek T-2 toksina v krmo piščancev (v koncentracijah 4 mg/kg in 5 mg/kg), tako kot v naši raziskavi, ni stimuliral lipidne peroksidacije in ni povečal produkcije MDA. Ugotovila pa sta, da je dodatek toksina v krmo znižal koncentracije vitamina E v jetrih, kar kaže, da bi T-2 toksin vendarle lahko imel prooksidativne učinke, ki pa se niso pokazali z merjenjem koncentracij MDA. Nasprotno pa sta Dvorska in Surai (2001) ugotovila, da je dodatek T-2 toksina v krmo prepelic stimuliral lipidno peroksidacijo in povzročil povečano akumulacijo MDA v jetrih. Koncentracija MDA v krvni plazmi se v našem poskusu z naraščajočo koncentracijo T-2 toksina ni statistično značilno spremenila glede na poskusno skupino. Tudi v drugem našem poskusu dodatek T-2 toksina in DON-a nista statistično značilno povečala koncentracije MDA v krvni plazmi. Naši rezultati ne potrjujejo nekaterih že objavljenih raziskav. Raziskava Mezes in sod. (1999) je pokazala, da dodajanje T-2 toksina poveča koncentracijo MDA in sicer različno glede na živalsko vrsto in tkiva.

Preglednica 4. Delež DNA v repu kometa, Repni moment po Olivu (OTM), koncentracija malondialdehida (MDA) v krvni plazmi, skupna antioksidativna kapaciteta (TAS) in glutation peroksidaza (GPx) pri 1) piščancih, krmljenih z različnimi koncentracijami T-2 toksina in mikotoksinskega vezalca ter 2) pri piščancih krmljenih z dodatkom T-2 toksina, DON-a in nukleotidov

Table 4. % DNA in the tail of the comet, Olive tail moment (OTM), concentration of malondialdehyde (MDA) in blood plasma, total antioxidative status (TAS) and glutathione peroxidase (GPx) of 1) chickens exposed to different concentrations of T-2 toxin and mycotoxin binder and 2) chickens fed T-2 toxin, DON and nucleotides

	% DNA v repu	OTM*	MDA v plazmi, nmol/ml	TAS, mmol/l	GPx, U/l
1) Piščanci krmljeni z dodatkom T-2 toksina in mikotoksinskega vezalca					
Kont	14,33 <sup>ab</sup>	3,17 <sup>ac</sup>	0,49	0,87 <sup>ab</sup>	10 162
T 0,5	10,90 <sup>b</sup>	2,56 <sup>a</sup>	0,44	1,01 <sup>a</sup>	10 062
T 1,5	16,75 <sup>a</sup>	3,86 <sup>ac</sup>	0,42	0,75 <sup>b</sup>	9 896
T 4,5	18,64 <sup>ac</sup>	4,98 <sup>c</sup>	0,41	0,94 <sup>ab</sup>	8 678
T 13,5	22,97 <sup>c</sup>	7,86 <sup>b</sup>	0,40	1,07 <sup>ab</sup>	9 375
T 13,5+	17,57 <sup>a</sup>	4,32 <sup>ac</sup>	0,50	0,99 <sup>ab</sup>	10 202
p	< 0,0001	< 0,0001	0,3146	0,0256	0,7343
2) Piščanci krmljeni z dodatkom T-2 toksina, DON-a in nukleotidov					
Kont	15,09 <sup>a</sup>	4,03 <sup>a</sup>	0,28 <sup>ab</sup>	0,64 <sup>a</sup>	18 170 <sup>ab</sup>
DON	18,98 <sup>b</sup>	5,59 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,60 <sup>ab</sup>	20 093 <sup>a</sup>
DON+	15,96 <sup>ab</sup>	4,27 <sup>a</sup>	0,26 <sup>ab</sup>	0,60 <sup>ab</sup>	17 220 <sup>ab</sup>
T-2	25,22 <sup>c</sup>	9,08 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,53 <sup>b</sup>	16 364 <sup>ab</sup>
T-2+	19,70 <sup>b</sup>	6,17 <sup>a</sup>	0,28 <sup>ab</sup>	0,54 <sup>b</sup>	15 172 <sup>b</sup>
p	< 0,0001	< 0,0001	0,0369	0,0063	0,0177

\* OTM = Olive tail Moment (Olive, 1992)

<sup>a, b, c</sup> LS- vrednosti, ki so označene z različnimi črkami, se znotraj poskusa statistično značilno razlikujejo; p < 0,05.

Med živalskimi vrstami, ki so jih vključili v raziskavo, so bile najbolj občutljive gosi, sledile so race in piščanci. Če pogledamo tkiva, so najbolj občutljivejša jetra, sledijo krvna plazma in rdeče krvne celice. Da T-2 toksin najbolj poškoduje jetra, potrjujeta tudi raziskavi Hoehler in Marquardt (1996) ter Dvorska in Surai (2001).

Do sedaj genotoksičnost T-2 toksina in DON-a še ni bila podrobno preučena in ne vemo natančno, s katerimi mehanizmi trihoteceni poškodujejo DNA. Lahko povzročijo direktne prelome DNA ali pa delujejo preko različnih epigenetskih mehanizmov. V naših raziskavah smo ugotovili, da 10 in 13,5 mg/kg T-2 toksina in 10 mg/kg DON-a v krmi povzroči poškodbe DNA v levkocitih (pregl. 4), merjene s kometnim testom in predstavljene kot % DNA v repu kometa in kot izračunani parameter Repni moment po Olivu (OTM) (Olive, 1992). Rezultati naše raziskave glede poškodb DNA so podprti z raziskavo Atroshi in sod. (1997), v kateri so ugotovili povečane poškodbe DNA v jetrih miši, ki so bile krmljene z dodatkom T-2 toksina in z raziskavo Rizzo in sod. (1998) v kateri so preučevali genotoksični vpliv T-2 toksina in DON-a na jetrne celice podgan.

Zmanjšana skupna antioksidativna kapaciteta (TAS), v naši drugi raziskavi, v skupini, ki je bila krmljena s T-2 toksinom, namiguje na povečan oksidacijski stres povzročen s T-2 toksinom, vendar rezultat ni podprt z rezultati glutation peroksidaze (GPx). Na drugi strani DON v krmi živali ni vplival na koncentracije TAS in GPx (pregl. 4). Nekatere študije dokazujejo, da je toksičnost mikotoksinov povezana z različnimi mehanizmi v organizmu (Surai and Dvorska, 2005), posledica česar so tudi različni vplivi in produkti. Do sedaj še ni bilo natančno raziskano, ali mikotoksini stimulirajo lipidno peroksidacijo direktno, s povečano produkcijo prostih radikalov, ali pa je povečana občutljivost tkiv na lipidno peroksidacijo povezana z antioksidativnim sistemom v organizmu.

Lipidno peroksidacijo, ki jo povzročajo toksini v krmi, lahko ublažimo z dodajanjem različnih prehranskih dodatkov. Imunski sistem piščancev, ki so izpostavljeni fuzarijskim toksinom, je pogosto oslavljen, kar pomeni, da so lahko bolj dovzetni za bakterijske in virusne infekcije (Dänicke, 2001). Naši raziskavi sta pokazali, da oba dodatka preprečita oz. odpravita poškodbe DNA imunskih celic. V naših poskusih dodatek mikotoksinskega vezalca krmi, ki je vsebovala 13,5 mg T-2 toksina/kg ter nukleotidov krmi, ki je vsebovala 10 mg T-2 toksina/kg ali DON-a nista imela vpliva na proizvodne lastnosti (pregl. 3 in 4). Tudi Dänicke in sod. (2003) so v raziskavi ugotovili, da dodatek vezalca v krmo piščancev, ki je vsebovala do 14 mg deoksinivalenola (DON), ni pokazal pričakovanih pozitivnih učinkov. Proizvodne lastnosti so se namreč, kljub uporabi mikotoksinskega vezalca, bistveno poslabšale. Tudi Karlovsky (1999) trdi, da pri omenjenem mikotoksinskem vezalcu ni odkril encimatske aktivnosti, ki naj bi bila ključna za detoksifikacijo toksinov iz skupine trihotecenov. V nasprotju z naštetimi raziskavami so naši rezultati pokazali, da dodatek mikotoksinskega vezalca krmi, ki je vsebovala 13,5 mg T-2 toksina/kg, zmanjša poškodbe DNA, prav tako smo ugotovili tudi pozitiven učinek dodatka nukleotidov, ki so zmanjšali poškodbe DNA pri živalih, ki so zauživale krmo z 10 mg/kg T-2 toksina oziroma DON-a. Iz rezultatov naših raziskav lahko zaključimo, da z dodajanjem mikotoksinskega vezalca v krmo lahko vsaj delno preprečimo absorpcijo mikotoksinov iz črevesja in tako zmanjšamo njihov negativni vpliv na imunski sistem, medtem ko z dodajanjem nukleotidov vplivamo na mehanizme popravljanja poškodb DNA imunskih celic, ki so jih povzročili toksini.

## SKLEPI

T-2 toksin v krmi, pri koncentracijah nad 4,5 g/kg, značilno zmanjša dnevne priraste piščancev, medtem ko DON pri koncentraciji 10 mg/kg ni vplival na proizvodne rezultate. Mikotoksinski vezalec ni izboljšal proizvodnih lastnosti piščancev krmljenih s 13,5 mg T-2

toksina na kilogram krme. Prav tako dodatek nukleotidov ni ugodno vplival na priraste in konverzijo krme pri piščancih krmljenih z 10 mg/kg DON-a ali T-2 toksina. Visoke dodane koncentracije T-2 toksina in DON-a krmi povzročijo poškodbe DNA v levkocitih merjene s kometnim testom. Oba uporabljena dodatka lahko zmanjšata oz. odpravita poškodbe DNA imunskih celic. Z dodajanjem mikotoksinskega vezalca v krmo lahko vsaj delno preprečimo absorpcijo mikotoksinov iz črevesja in tako zmanjšamo negativni vpliv toksinov, medtem ko z dodajanjem nukleotidov vplivamo na mehanizme popravljanja poškodb DNA imunskih celic, ki so jih povzročili toksini. Oba dodatka bi bila lahko primerna za izboljšanje delovanja imunskega sistema, v primeru prisotnosti fuzarijskih mikotoksinov v krmi, vendar bodo za potrditev potrebne še nadaljnje raziskave.

## VIRI

- Atroshi, F./ Rizzo, A./ Biese, I./ Linberg, L.A./ Saloniemi H. Effect of feeding T-2 toxin and deoxynivalenol on DNA and GSH contents of brain and spleen of rats supplemented with vitamin E and C and selenium combination. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 74(1995), 157–164.
- Cameron, B.F./ Wong, C.W./ Hinch, G.N./ Singh, D./ Nolan, J.V./ Colditz, I.G. Effects of nucleotides on the immune function of early-weaned piglets. V: *Digestive Physiology of Pigs* (ur.: Lindberg, J.E./ Ogle, B.). UK, CABI Publishing, 2001, 6–69.
- Chirico, S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in Enzymology*, 233(1994), 314–318.
- Dänicke, S. Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain. V: *Proceedings of 13th European Symposium on Poultry Nutrition and Ascites workshop*. Belgium, Blankenberge, 2001, 98–110.
- Dänicke, S./ Matthes, S./ Halle, I./ Ueberschar, K.H./ Doll, S./ Valenta, H. Effects of graded levels of Fusarium toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters. *British Poultry Science*, 44(2003), 113–126.
- Dvorska, J.E./ Surai, P.F. Effects of T-2 toxin, zeolite and Mycosorb on antioxidant systems of growing quail. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(2001)12, 1752–1757.
- Eriksen, G.S./ Pettersson H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114(2004)4, 205–239.
- Fink-Gremmels J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21(1999), 115–120.
- Frankič, T./ Pajk Žontar, T./ Rezar, V./ Levart, A./ Salobir, J. The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food Chemistry and Toxicology*, 44(2006)11, 1838–1844.
- Frankič, T./ Salobir J./ Rezar. V. The effect of vitamin E supplementation on reduction of lymphocyte DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 41(2008), 274–286.
- Fukunaga, K./ Takama, K./ Suzuki, T. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry*, 230(1995), 20–23.
- Garcia, A.R./ Avila, E./ Rosiles, R./ Petrone, V.M. Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Avian Diseases*, 47(2003)3, 691–699.
- Hoehler, D./ Marquardt, R.R. Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poultry Science*, 75(1996)12, 1508–1515.
- Holen, E./ Jonsson, R. Dietary nucleotides and intestinal cell lines: I. Modulation of growth. *Nutrition Research*, 24(2004), 197–207.
- Karlovsky, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 7(1999), 1–23.
- Karppanen, E./ Rizzo, A./ Saari, L./ Berg, S./ Bostrom, H. Investigation on trichothecene stimulated lipid peroxidation and toxic effects of trichothecenes in animals. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 30(1989), 391–399.
- Kubena, L.F./ Huff, W.E./ Harvey, R.B./ Corrier, C.R. Influence of ochratoxin A and deoxynivalenol on growing broiler chicks. *Poultry Science*, 67(1988), 253–260.
- Kubena, L.F./ Edrington, T.S./ Harvey R.B./ Buckley, S.A./ Phillips, T.D./ Rottinghaus, G.E./ Casper H.H. Individual and combined effects of fumonisin B1 present in fusarium moniliforme culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poultry Science*, 76(1997), 1239–1247.
- Leal, M./ Shimada, A./ Ruiz, F./ De Mejia, E.G. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin *in vivo*. *Toxicology Letters*, 109(1999)1–2, 1–10.



- Leeson, S./ Diaz, G./ Summers, J.D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph, Canada, University books, 1995, 352 str.
- Mezes, M./ Barta, M./ Nagy, G. Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Research in Veterinary Science*, 66(1999)1, 19–23.
- NRC. Nutrient requirements of poultry. Washington, D.C. National Academy Press, 1994, 157 str.
- Olive, P.L./ Wlodek, D./ Durand, R.E./ Banath, J.P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel-electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198(1992)2, 259–267.
- Pasteiner, S. Coping with mycotoxin-contaminated feedstuffs. *Feed International*, 4(1997), 12–17.
- Perez, M.J./ Sanchez-Medina, F./ Torres, M./ Gil, A./ Suarez, A. Dietary nucleotides enhance the liver redox state and protein synthesis in cirrhotic rats. *The Journal of Nutrition*, 134(2004), 2504–2508.
- Raju, M.V.L.N./ Devegowda, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, 41(2000), 640–650.
- Rizzo, A.F./ Atroshi, F./ Ahotupa, M./ Sankari, S./ Elovaara E. Protective effects of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *Journal of Veterinary Medicine A*, 41(1994), 81–90.
- Rizzo, A./ Biese, I./ Vejjalainen, P./ Antila, E./ Westermarck, T./ Atroshi, F. 1998. Mycotoxins induced DNA oxidative damage in rat liver cell. *Pathophysiology*, 5(1998)1, 81.
- SAS/STAT User's guide. Version 8., Vol. 2. Cary, SAS Institute, 2000, 1162 str.
- Singh, N.P./ McCoy, M.T./ Tice, R.R./ Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1988), 184–191.
- Smith, T.K./ Modirsanei, M./ MacDonald, E.J. The use of binding agents and amino acid supplements for dietary treatment of *Fusarium* mycotoxicoses. V: *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of alltech sixteenth annual symposium.* (ur.: Lyons, T.P./ Jacques, K.A.). Nottingham, Nottingham University Press, 2000, 383–390.
- Surai, P.F. Natural antioxidants and mycotoxins. V: *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction* (ur.: Surai, P.F.). Nottingham, Nottingham University Press, 2002, 445–509.
- Surai, P.F./ Dvorska, J.E. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. V: *The mycotoxin blue book.* (ur.: Diaz, D.). Nottingham, Nottingham University Press, 2005, 93–137.
- Surai, P.F./ Speake, B.K./ Sparks, N.H.C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. *Journal of Poultry Science*, 38(2001), 117–145.
- Veldman, B. Mycotoxins in the animal production chain. V: *Meeting the mycotoxin menace.* (ur.: Barug, D./ Van Egmond, H.P./ Lopez-Garcia, R./ Van Osenbruggen, W.A./ Visconti, A.). Wageningen, Wageningen Academic Publishers, 2004, 319 str.
- Vila, B./ Jaradatb, Z.W./ Marquardt, R.R./ Frohlich, A.A. Effect of T-2 toxin on *in vivo* lipid peroxidation and vitamin E status in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2002), 479–486.
- Wong, S.H./ Knight, J.A./ Hopfer, S.M./ Zaharia, O./ Leach, C.N./ Sunderman, F.W. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33(1987), 214–220.
- Wood, G.E. Mycotoxins in food and feeds in the United States. *Journal of Animal Science*, 70(1992), 3941–3949.
- Yegani, M./ Smith, T.K./ Leeson, S./ Boermans, H.J. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of broiler breeders. *Poultry Science*, 85(2006), 1541–1549.