SROVNÁNÍ PŘÍPRAVKŮ NA ADSORBCI MYKOTOXINŮ A JEJICH VLIV NA VYBRANÉ UKAZATELE KANČÍHO SPERMATU

Z. Tvrdoň, M. Čechová

Došlo: 27. června 2006

Abstract

TVRDOŇ, Z., ČECHOVÁ, M.: *A comparison of mycotoxin adsorbents and their effects on some selected parameters of boar semen.* Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2006, LIV, No. 4, pp. 111–116

Effect of two mycotoxin adsorbents with different mechanisms of action were followed in 180 purebred and terminal combination boars reared in artificial insemination stations. The following parameters of boar sperm quality were investigated: volume in millilitres, concentration and motility, and numbers of pathological spermatozoa. When processing the boar semen, the dilution ration and numbers of AI doses were recorded. Compared were two preparations: in case of *Preparation 1* the number of evaluated ejaculates was 1,037 while in case of *Preparation 2* altogether 1,109 ejaculates were evaluated. Boars receiving diets with *Preparation 1* produced more voluminous ejaculates (by 4.1 ml) and their concentration of spermatozoa was also higher (by 39 thous./ml; $P \leq 0.001$). Dilution parameters were better as well and numbers produced of AI doses were also higher. In case of *Preparation 2* the motility of spermatozoa was a higher while the numbers of sperms were lower. The obtained results demonstrated that a suitable adsorbent can show a positive effect on both quantitative and qualitative parameters of boar sperm.

mycotoxins, boars, insemination doses, adsorbents, health status

Kontaminace zemědělských produktů plísněmi (houbami), schopnými produkovat toxické metabolity (mykotoxiny), je celosvětový problém, kterému se nelze vyhnout. Konkrétní výskyt je závislý na regionu a na individuální toleranci k obsahu vody (vlhkosti), pH a preferenci substrátu (Abramson et al., 1997; Magnoli et al., 1998; Müller et al., 1999 a, b). Kontaminace krmivářských komodit plísněmi a mykotoxiny je jeden z negativních faktorů, který ovlivňuje zdraví a užitkovost zvířat (Steyen, 1998; Scudamore et al., 1998 a, b). O nepříznivém vlivu na přírůstek, konverzi krmiva a odolnost proti infekčním nemocem pojednává Charmley et al., (1995). O negativním působení plísní skupiny *Aspergillus* informuje Byrem et al., (1999 a, b). Jako příklad uvádějí kyselinu cyklopiazonovou (CPA), která narušuje kvalitu vepřového masa, přesťo však naměřené koncentrace nepředstavují výrazné

riziko pro spotřebitele. Typickým toxinem plísní rodu *Penicillium* je ochratoxin A, který způsobuje poškození ledvin. Vyvolává tubulární poškození a fibrozu ledvin (Mills et al., 1995). Mezi další negativní vlivy patří narušení koagulace, imunoseprese a indukce tumorů v močovém traktu (Marquart a Frohlich, 1992). Další toxické účinky byly pozorovány při experimentálním krmení vysokými dávkami toxinu. O ochratoxinu jako potenciálním rizikovým faktoru v dietách člověka ve vztahu edemické nefropatii a výskytu tumoru močového traktu pojednává (Fink-Gremmels, 1998; Peraica et al., 1999). Mezi hojně rozšířené mykotoxiny produkované plísněmi skupiny *Fusarium* patří toxin T-2 a deoxynivalenol (DON, vomitoxin). DON není tolik agresivní jako toxin T-2. Po orálním požití způsobuje podráždění a zánětlivé reakce. Zvracení je pozorováno u prasat v dávkách překračujících 12 ppm. Pokud

koncentrace v krmivu dosáhne 1000 µg/kg, dochází ke snížení přírůstku, což je zpočátku vysvětlováno odmítáním krmiva. Dalším typickým příznakem je zvýšení Ig A v lymfatickém systému souvisejícím se střevy (Roter et al., 1996). Nedávná zjištění ukazují na zvýšení citlivosti k infekčním nemocem včetně virových. Dále byla prokázána indukce cytokinů, které vedou k narušení imunitní odezvy (Kinser et al., 2004; Pestka et al., 2004). Mezi nejvíce rozšířené fusariové mykotoxiny patří zearalenon (ZEA). Jeho negativní účinek spočívá v jeho vazebné schopnosti k receptorům estrogenů v různých cílových tkáních (Malekinejad et al., 2004). Velice citlivě na něj reagují mladé prasničky v období před pohlavní dospělostí. Projevuje se otokem vulvy, zvětšením dělohy a mléčných žláz (Diekman a Greene, 1992). Následně dochází k prodloužení intervalu mezi říjemi, k poklesu plodnosti a perzistenci žlutého tělíska. Prasnice rodí nevyrovnaná selata s velkým poporodním úhynem. U předpubertálních kanců se objevuje zvětšení předkožky, kanci mají snížené sexuální libido a nižší koncentraci testosteronu spojenou s nižší spermatogenezí. Předpubertální prasničky vykazují klinické příznaky již od hladiny 0,06 mg/kg tělesné hmotnosti; tzv. hyperestrogenizace. Celá věc je komplikována tím, že mnohé mykotoxiny vykazují vzájemné interakce (Kubena et al., 1997). Interakce mohou být synergistické, jako je tomu u trichothecenů, nebo antagonistické v případě společného působení zearalenonu a trichothecenů.

Cílem práce bylo ověření vlivu dvou adsorbentů mykotoxinů aplikovaných do krmné směsi na vybrané ukazatele kančího spermatu na inseminační stanici.

MATERIÁL A METODIKA

Sledování probíhalo na podnikové inseminační stanici kanců. V době od 15. 5. 2002 do 31. 8. 2002 byly do granulované krmné směsi KA pro plemenné kance přidávány přípravky na vyvazování mykotoxinů na bázi minerálních jíílů – *přípravek 1* a druhý přípravek na bázi výtažků z buněčných membrán – *přípravek 2*. Dávkování obou přípravků bylo po celé krmné období 1,5% (tj. 1,5 kg na tunu krmné směsi). Od 15. 5. 2002 do 30. 6. 2002 proběhlo návykové období a od 1. 7. 2002 do 31. 8. 2002 proběhlo vlastní sledování.

Do sledování bylo zahrnuto 180 plemenných kanců ustájených ve dvou identických stájích po 90 kusech. Ustájení bylo individuální, v bezstelivových koticích. Krmení bylo 2× denně v dávce cca 3,5 kg krmné směsi KA na kus a den. Kanci měli ad libitní přístup k vodě, napájení bylo z kolíkových napáječek. V letním období byla kancům do koryta přidávána voda. Krmná směs byla vyráběna v komerční míchárně a měla následující parametry: 13 MJ ME, 0,6 g lyzinu a 160 g NL. Krmná směs byla vyšetřena na obsah plísní. Obsah mykotoxinů zearalenonu a ochratoxinu A byl stanoven ELI-

SA metodou pod detekční hranicí citlivosti metody. Vzorky byly odebírány z venkovních zásobníků vždy nejpозději do dvou dnů od návozu nové krmné směsi. Rozbory byly provedeny v akreditované laboratoři státního veterinárního ústavu v celkovém počtu osmi stanovení vždy dva vzorky z každé experimentální stáje ve dvou pokusných měsících.

Plemenná skladba v obou stájích byla totožná (rovnoměrné zastoupení čistokrevných a hybridních plemenných kombinací). Frekvence odběrů ejakulátu 7–8× měsíčně. Do hodnocení byly zahrnuty všechny ejakuláty, včetně těch, které byly následně vyřazeny z výroby inseminačních dávek (ID). K ředění ejakulátu kanců byl použit jeden typ ředidla.

Kontrolní skupina plemenných kanců nebyla z provozních důvodů stanovena.

Hodnocené ukazatele byly stanovovány podle ČSN 467114. V pokusu byl hodnocen *objem ejakulátu* v ml po odfiltrování tuhé frakce výměšků Cowperových žláz. *Koncentrace spermií* je udána v počtu spermií v tisících v 1 ml ejakulátu. *Motilita a patomorfologicky změněné spermie* jsou udány v procentech. *Počet inseminačních dávek* je uveden v kusech. Počet spermií v inseminační dávce je uveden jako počet oplození schopných spermií (po odečtení nepohyblivých a patomorfologicky změněných spermií) v miliardách. *Poměr ředění* je udán jako počet dílů ředidla na jeden díl ejakulátu.

Ke zpracování byl použit statistický program STATISTICA Cz (2001). Stanoveny byly základní statistické charakteristiky, následně byla provedena jednofaktorová analýza variance jednotlivých systematických vlivů s následným testováním rozdílů (Tukey test).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Tabulky I a II zaznamenávají základní statistické charakteristiky vybraných ukazatelů kvantity a kvality kančího spermatu podle použitého přípravku v krmné směsi. Základní sledovaný ukazatel – objem ejakulátu byl v hodnoceném období vyšší u *přípravku 1* o 4,1 ml (243 ml) v porovnání s *přípravkem 2*. Velký rozdíl byl zjištěn mezi adsorbenty u koncentrace spermií. U skupiny kanců, kde byl podáván *přípravek 1*, byla zjištěna vyšší hodnota o 39 tis. spermií na 1 ml ejakulátu (415,3 vs. 376,3). Vyšší motilita a nižší výskyt patologicky změněných spermií byl o 0,5 a o 0,4 % prokázán u *přípravku 2*. Poměr ředění a výroba inseminačních dávek byly u *přípravku 1* o 0,5 a 1,6 vyšší ve srovnání s *přípravkem 2*. Zvýšení produkce inseminačních dávek při aplikaci *přípravku 1* je důvodem, který zlepšuje ekonomiku výroby. Jarczyk et al., 1998 sledoval u prasat mezi 20–80 kg růstovou schopnost a biochemické parametry krevního séra prasat na dietě kontaminované ochratoxinem A a rovněž zjistil pozi-

tivní vliv použitého adsorbentu na parametry užito-
vosti. O negativním vlivu mykotoxinů na imunitní
systém u laboratorních zvířat pojednává (Bondy a Pet-
ska, 2000; Oswald a Comera, 1998). Imunosupresiv-
ní účinky mykotoxinů na buněčné i humorální úrov-
ni způsobují pokles odolnosti hostitelského organismu
k infekčním nemocem. U prasat vedla mykotoxinová
kontaminace ke spontánním infekcím bakteriemi *Ser-*
pulina hyodysenteriae a *Cymphylobacter* (Stoev et al.,
2000). Další doklad o negativním působení na zdra-
ví prasat podává (Fornout et al., 2000; Oswald et al.,
2003). Aplikace fumonisinu B₁ v dávce 0,5 mg/kg
tělesné hmotnosti snižuje aktivaci zánětlivých buněk
v tenkém střevě. O nutnosti produkce kvalitního sper-

matu a tím i kvalitních inseminačních dávek se zabý-
vá ve své studii (Smital, 2003). Intenzivní využívání
kanců v inseminaci vytváří tlak na sledování jejich
schopnosti produkovat dostatečné množství živo-
ta způsobilých spermií. Z toho vyplývá nutnost hod-
nocení kvality a kvantity spermatu kanců a důležitost
zapojení těchto informací do procesu šlechtění. Veliký
vliv na následnou kvalitu spermatu má i typ použitého
ředidla (Věžník et al., 2003). Ředění kančího ejakulá-
tu ovlivňuje také úroveň membrán, zejména nejsou-
li dodrženy podmínky adekvátního pH, iontová síla,
typ iontů a osmotický tlak. Velkou pozornost je tře-
ba věnovat přítomnosti proteinových složek semenné
plazmy stimulujících motilitu spermií.

I: Základní statistické charakteristiky kančího ejakulátu – přípravek 1

Parametr	Objem ml	Koncentr. tis.	Motilita %	Patologie %	Poměr ředění	Produkce ID ks
n	1037	1037	1037	1037	1037	1037
Průměr	243,0	415,3	70,5	9,7	6,1	30,2
Střední chyba	3,1	6,5	0,3	0,2	0,1	0,5
Sm. odchylka	98,6	208,1	8,8	7,4	4,2	16,5
Rozptyl	9712,2	43291,8	77,8	54,7	18,0	272,3
Min.	80	30	10	0	0	0
Max.	700	875	90	80	21	82

II: Základní statistické charakteristiky kančího ejakulátu – přípravek 2

Parametr	Objem ml	Koncentr. tis.	Motilita %	Patologie %	Poměr ředění	Produkce ID ks
n	1109	1109	1109	1109	1109	1109
Průměr	238,9	376,3	71,0	9,3	5,6	28,6
Střední chyba	2,6	5,9	0,2	0,2	0,1	0,5
Sm. odchylka	87,6	196,0	8,2	6,8	3,9	16,0
Rozptyl	7665,9	38431,1	67,8	46,5	15,0	256,9
Min.	30	80	10	0	0	0
Max.	600	875	90	50	21	135

V tabulce III. jsou uvedeny výsledky analýzy varian-
ce, přičemž statisticky velmi vysoce průkazně byl zjiš-
těn vliv použitého adsorbentu na koncentraci spermií
v ejakulátu. U dalších hodnocených vlastností průkaz-
nosti nebyly zjištěny. Průkaznost rozdílu je zazname-

nána v tabulce IV. Z tabulky je zřejmý průkazný rozdíl
použitých přípravků na koncentraci spermií v ejakulá-
tu kanců ve prospěch *přípravku 1*. Rozdíly v dílčích
ukazatelích kvality kančího ejakulátu při použití rozdíl-
ných adsorbentů jsou také zřejmé z grafu 1.

III: Hodnoty analýzy variance sledovaných adsorbentů

Faktor	d.f.	Objem ml		Koncentrace tis.		Motilita %		Patologie %	
		MS	Sign.	MS	Sign.	MS	Sign.	MS	Sign.
Přípravek	1	9249,141	NS	813383,19	***	190,14	NS	69,07	NS
Error	2144	8654,67		40779,82		72,65		50,45	

$P \leq 0.001$

IV: Průkaznosti rozdílu hodnocených přípravků

Adsorbent	Objem ml		Koncentrace v tis.		Motilita %		Patologie %	
	Průměr	Sign.	Průměr	Sign.	Průměr	Sign.	Průměr	Sign.
1	243,02	a	415,28	a	70,45	a	9,69	a
2	238,86	a	376,2	b	71,04	a	9,34	a

1: Srovnání dílčích ukazatelů kvality kančího ejakulátu při použití rozdílných adsorbentů

Zařazení adsorbentů mykotoxinů u kanců na inseminačních stanicích má proto své opodstatnění. Volba vhodného přípravku se tak příznivě může projevit na zdravotní úrovni organismů kanců. I přestože ve

zkrmované směsi nebyla zjištěna přítomnost vybraných mykotoxinů, je preventivní aplikace adsorbentů žádoucí.

SOUHRN

U 180 kanců čistokrevných a hybridních kombinací ustájených na inseminační stanici byl sledován vliv dvou adsorbentů mykotoxinů s různým mechanismem účinku. U kanců byly sledovány vybrané ukazatele kvality kančího spermatu: objem v ml, koncentrace spermií, motilita výskyt patologických spermií. Při zpracování spermatu se sledoval poměr ředění a počet vyrobených inseminačních dávek. Počet hodnocených ejakulátů u *přípravku 1* byl 1037 a u *přípravku 2* 1109. Kanci, kterým byla podávána dieta s obsahem *přípravku 1*, měli o 4,1 ml více vyprodukovaného ejakulátu. Taktéž byla zjištěna vyšší koncentrace spermií o 39 tis./ml ($P \leq 0,001$). Dále rovněž ejakuláty produkované na *přípravku 1* vykazovaly příznivější parametry ředění ejakulátu a počtu vyrobených inseminačních dávek. Vyšší motilita a nižší výskyt patologicky změněných spermií byl prokázán u *přípravku 2*. Pokus nám dokládá, že volba vhodného adsorbentu může příznivě ovlivnit parametry produkce spermatu kanců.

mykotoxiny, kanci, inseminační dávka, adsorbenty, zdraví

Studie byla zpracovaná s podporou grantu NAZV QF3218.

LITERATURA

- ABRAMSON, D., MILLS, J. T., FROHLICH, A. A., MARQUARD, T.: Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982–1994. Canadian Journal Veterinary Research, 1997, 61: 49–52.
- BYREM, T. M., BOOREM, G. M., HILL, F. S., STRASBURGT, G. M., CHU: The effect of cyclo-

- piazonic acid on the development of pale, soft and exudative pork from pigs of defined malignant hyperthermia genotype. *Journal Animal Science*, 1999a, 77: 166–172.
- BYREM, T. M., PESTKA, J. J., STRASBURGT, G. M., CHU: Analysis and pharmacokinetics of cyclopiazonic acid in market weight pigs. *Journal Animal Science*, 1999b, 77: 173–179.
- BONDY, G. S., PESTKA, J. J.: Immunomodulation by fungal toxin. *J. Toxicol. E. Health*, part B, 2000, 3: 109–143.
- CHARMLEY, L. L., TRENDHOLM, H. L., PRELUSKY, D. B., ROSENBERG, A.: Economic losses and decontamination. *Natural Toxin*, 1995, 3: 199–203, 221.
- ČSN 467114: Sperma kance a inseminace v chovu prasat
- DIEKMAN, M. A., GREEN, M. L.: Mycotoxin and reproduction in domestic livestock. *Journal Animal Science*, 1992, 70: 1615–1627.
- FINK-GREMMELES, J.: Mycotoxins: Mechanism of action at the molecular level. In: Milagria, M. et al. *Mycotoxins and Phycotoxin – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, 1998: 247–262.
- FORNOUT, S., FAIBROTHER, J. M., VERNEUIL, S., LE BARS, P., LAFFITTE, J., LE BARS, J., OSWALD, I. P.: Effects d'une intoxication orale par la fumonisine B₁ sur la production intestinale de cytokines inflammatoires et la sensibilité des porcelets à l'infection colibacillaire. *Journées de la recherche porcine. J. Rech. Porcine en France*, 2000, 32: 33–37.
- JARCZYK, A., WASILEWSKA, A., JEDRYCZKO, R., JEDRYCHOWSKI, L., WROBLEWSKA, B.: Results of pigs fattening feeding with mixed meals with ochratoxin A contamination and the some biochemical factors in blood serum. In: *Konferencja Naukowo-Promocyjna, Lepsza żywność, Olsztyn-Kortowo*, 1998: 179–185.
- KINSER, S., JIA, Q., LI, A., LAUGHTER, P., CORNWELL, J. C., CORTON, J., PESTKA, S.: Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2004, 67 (18): 1423–1441.
- 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*, 1997, 76: 1239–1247.
- MAGNOLI, C., DALCERO, A. M., CHIACCHIERA, R., MIAZO, SAENZ, M. A.: Enumeration and identification of *Aspergillus* and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*, 1998, 142: 27–32.
- MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R. F., FICK-GREMMLES, J. F.: Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. PhD Thesis Utrecht University. 2004: 88
- MARQUARD, R. R., FROHLICH, A. A.: A review on recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal Animal Science*, 1992, 70: 3968–3988.
- MILLS, J. T., SEIFERT, K. A., FRISVAD, J. C., ABRAMSON, D.: Nephrotoxicogenic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada. *Mycopathologia*, 1995, 130: 23–28.
- MÜLLER, G., KIELSTEIN, P., ROSNER, H., BERNDT, A., HELLER, M., KOHLER, H.: Studies of the influence of ochratoxine A on immune and defence reactions in weaners. *Mycoses*, 1999a, 42: 495–505.
- MÜLLER, G., KIELSTEIN, P., ROSNER, H., BERNDT, A., HELLER, M., KOHLER, H.: Studies of the influence of combined ochratoxine A, fumonisin B₁, deoxynivalenol and T-2 toxin on immune and defence reactions in weaned pigs. *Mycoses*, 1999b, 42: 485–493.
- OSWALD, I. P., COMERA, C.: Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 1998, 149: 585–590.
- OSWALD, I. P., DESAULETS, C., LAFFITTE, J., Fournout, S., PERCS, S. Y., ODIN, M., LE BARS, P., LE BARS, J., FAIBROTHER, J. M.: The mycotoxin, fumonisin B₁, increases intestinal colonization by pathogenic *E. coli* in pigs. *Appl. Env. Microbiol.*, 2003, 69: 5870–5874.
- PASTECA, S., KRAUSE, C. D., WALTER, M. R.: Interferons, interferon-like cytokines and their receptors. *Immunol. Rev.*, 2004, 202: 8–32.
- PERAICA, M., DOMIJAN, A. M., FUCHS, R., LUCIC, A., RADIC, B.: The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters*, 1999, 110: 105–112.
- ROTTER, B. A., PRELUSKY, D. B., PESTKA, J. J.: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicology Environmental Health*, 1996, 48: 1–34.
- SCUDAMORE, K. A., NAWAZ, S., HETMASKI, M. T.: Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Additives and Contaminants*, 1998a, 15: 30–55.
- SCUDAMORE, K. A., NAWAZ, S., HETMASKI, M. T., HETMASKI, S. C.: Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: III Determination of mycotoxins in rice bran. *Food Additives and Contaminants*, 1998b, 15: 185–194.
- SMITAL, J.: Možnosti využití ukazatelů spermatu při selekci kanců. Interní materiál pro SCHP v Čechách a Moravě. 14 s.

- STATISTICA Cz: StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA Cz [Softwarový systém na analýzu dat], verze 6. www.StatSoft.Cz
- STEYN, P. S.: The biosynthesis of mycotoxins. *Revue de Medicine Veterinaire*, 1998, 149: 469–478.
- STOEV, S. D., GOUNDASHEVA, D., MIRTCHIEVA, T., MANTLE, P. G.: Susceptibility to secondary bacterial infections in pigs as an early response in ochratoxicosis. *Exp. Tox. Pathol.*, 2000, 52: 287–296.
- VĚŽNÍK, Z., ŠVECOVÁ, D., ZAJÍCOVÁ, A.: Ovlivnění funkčních ukazatelů spermií testovanými ředidly kančích ejakulátů. *Náš chov*, 2003, 10: 38–44.

Adresa

Ing. Zdeněk Tvrdoň, Ph.D., Genoservis, a. s. Olomouc, Jožky Jabůrkové 1, 774 79 Olomouc, Česká republika,
Doc. Ing. Marie Čechová, CSc., Ústav chovu a šlechtění hospodářských zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika