

JC-1 (Molecular Probes, USA) służył do pomiaru zmian ΔY_m w komórkach. W żywych, nieapoptotycznych komórkach JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide/chloride) gromadził się w mitochondriach w postaci agregatów, co w mikroskopie fluorescencyjnym widoczne było w postaci czerwono-pomarańczowej fluorescencji, natomiast w komórkach apoptotycznych i nekrotycznych, w których nastąpiła depolaryzacja błony mitochondrialnej i spadek ΔY_m , gromadził się w formie monomerycznej i wybarwiał komórki na zielono.

c) ocenę stanu akrosomów plemników. Wizualizację stanu akrosomów plemników knura przeprowadzono przy zastosowaniu barwienia lektyną z orzeszków ziemnych sprzężoną z fluoresceiną (FITC-PNA/PI Sigma, USA).

Uzyskane wyniki dotyczące jakości nasienia poddano analizie statystycznej za pomocą pakietu statystycznego Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Poziom istotności szacowano testem Duncan (Duncan Multiple Range Test).

Wyżej wymienione metody fluorescencyjne zastosowano również w celu oceny nasienia świeżego przed procedurą kriokonserwacji. Wyniki zamieszczono w tabeli 1. W nasieniu świeżym odsetek plemników żywych (YO-PRO-1/PI⁻), plemników apoptotycznych (YO-PRO-1⁺/PI⁻) oraz odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem (FITC-PNA⁻/PI⁻) wyniósł odpowiednio: 88,5 ± 6,1%; 3,7 ± 1,5% oraz 86,8 ± 6,7%.

Wyniki modyfikacji rozcieńczalnika laktozowego na podstawie różnych stężeń mieszaniny białek roślinnych i/lub lecytyny sojowej przedstawiono w tabeli 2. Ocena plemników kriokonserwowanych w zmodyfikowanym rozcieńczalniku laktozowym wykazała, że najwyższy odsetek plemników wykazujących ruch postępowy stwierdzono w rozcieńczalniku laktozowym z dodat-

kiem 15% lecytyny sojowej (36,6 ± 3,4%). Wszystkie pozostałe modyfikacje powodowały istotny spadek ruchliwości w stosunku do kontrolnego rozcieńczalnika żółtkowo-laktozowego. Jednocześnie w rozcieńczalniku kontrolnym uzyskano najwyższy odsetek plemników z wysokim ΔY_m (41,2 ± 9,5%). Niezależnie od rodzaju rozcieńczalnika zastosowanego do mrożenia, udział plemników apoptotycznych (YO-PRO-1⁺/PI⁻) wahał się od 22,6 ± 2,1 do 26,7 ± 2,9%. Najwyższy odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem (FITC-PNA⁻/PI⁻) odnotowano w rozcieńczalniku kontrolnym i rozcieńczalniku laktozowym z dodatkiem 15% lecytyny sojowej (35,6 ± 5,1% vs. 32,1 ± 3,7%).

Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że żółtko jaja kurzego rutynowo stosowane w kriokonserwacji nasienia knura może zostać zastąpione składnikiem pochodzenia roślinnego bez obniżenia jakości nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania. Zastąpienie żółtka jaja kurzego w rozcieńczalniku mrożeniowym 15% lecytyną sojową pozwala na uzyskanie nasienia o parametrach porównywalnych z nasieniem kriokonserwowanym w standardowym rozcieńczalniku żółtkowo-laktozowym.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego N N311 524840 oraz działalności statutowej IZ-PIB, podzadanie nr. 02-5.06.1.

Literatura: 1. Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E., 2003 – Theriogenology 60, 269-279. 2. Beccaglia M., Anastasi P., Luvoni G.C., 2009 – Vet. Res. Commun. 33, 77-80. 3. Cuello C., Antonia Gil M., Parrilla I., Tornel J., Vazquez J. M., Roca J., Berthelot F., Martinat-Botte F., Martinez E. A., 2004 – Theriogenology 62, 353-361. 4. Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M., Rath D., 2008 – Theriogenology 70, 1225-33. 5. Trzcińska M., Bryła M., Gogol P., Cegła M., 2013 – Kriokonserwacja nasienia knura. ISBN 978-83-7607-296-3, s. 1-12.

Substitution of animal protein with plant proteins in cryopreservation of boar semen

Summary

Plant protein supplementation in extenders is hygienically safe and eliminates the risk of microbiological contamination. As one of the phospholipids, soya lecithin plays an important role in regulation of the physiological functions of the cell membrane. Moreover, like egg yolk, soya lecithin has properties protecting animal spermatozoa against cold shock during semen cryopreservation. The study was undertaken to determine the effect of adding a mixture of several plant proteins and soya lecithin (Pp) (Animal Pharma BV, the Netherlands) and soya lecithin alone (LS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) on the quality of frozen boar semen. The following semen parameters were assessed: sperm motility, plasma membrane integrity (YO-PRO-1/PI⁻), mitochondrial transmembrane potential and acrosome integrity. The best result was obtained for the extender supplemented with 15% soya lecithin, with 36.6% of sperm cells exhibiting progressive motility, 39.5% with plasma membrane integrity (YO-PRO-1/PI⁻) and 32.1% with acrosome integrity. In conclusion, soya lecithin at a concentration of 15% can replace egg yolk extender in cryopreservation of boar semen.

KEY WORDS: plant proteins, soya lecithin, cryopreservation, boar

Mikotoksyny w paszach – zagrożenie dla królików

Dorota Kowalska

Institut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Balicach koło Krakowa

Mikotoksyny to toksyczne, wtórne metabolity niektórych gatunków grzybów strzępkowych, należących głównie do rodzajów

Aspergillus, *Penicillium* i *Fusarium*. Mogą stanowić zanieczyszczenie żywności i pasz, zwłaszcza zbóż, produktów zbożowych, orzechów, nasion oleistych, mleka i mięsa. Obecnie żaden z regionów geograficznych nie jest wolny od występowania mikotoksyn. Zanieczyszczenie tymi związkami dotyka corocznie 25% światowych plonów. Niezależnie od tego, czy jest to obszar strefy umiarkowanej, subtropikalnej czy tropikalnej, jeżeli w okresie zbioru występuje wysoka wilgotność powietrza, zakażenie ziarna grzybami strzępkowymi staje się wysoce prawdopodobne. Obecnie poszczególne kraje i regiony dzieli się na obszary o wysokim i niskim ryzyku występowania określonych mikotoksyn (tab.).

Grzyby ze względu na rodzaj podłoża, na którym się rozwijają, dzieli się na szczepy fitopatogeniczne i saprofityczne. Grzyby

Tabela

Mikotoksyny charakterystyczne dla różnych regionów (<http://agraplant.pl/zatruta-pasza/>)

Region	Mikotoksyny
Europa Zachodnia	Ochratoksyna, deoksyniwalenol, zearalenon
Europa Wschodnia	Zearalenon, deoksyniwalenol
Ameryka Północna	Ochratoksyna, deoksyniwalenol, zearalenon, aflatoksyny
Ameryka Południowa	Aflatoksyny, fumonizyny, ochratoksyna, deoksyniwalenol, toksyna T-2
Afryka	Aflatoksyny, fumonizyny, zearalenon
Azja	Aflatoksyny
Australia	Aflatoksyny, fumonizyny

fitopatogeniczne, inaczej grzyby polowe, atakują rośliny podczas wzrostu na polu. Największe zagrożenie stanowią gatunki należące do rodzaju *Fusarium*. Infekują one zboża drobnoziarniste, kukurydzę, ziemniaki i inne rośliny uprawne, wywołując różne fuzariozy, choroby zarówno przed-, jak i powstające, obniżające ich wartość konsumpcyjną i handlową. Wytwarzane przez nie mikotoksyny, głównie trichoteceny i zearalenon, akumulują się w ziarnie jeszcze przed żniwami, wpływając negatywnie na zdrowotność rośliny. Szczepy saprofityczne, biorące udział w mineralizacji szczątków organicznych, głównie roślinnych, rozwijają się dopiero podczas magazynowania ziaren i nasion. Grzyby te wymagają do rozwoju zwykle mniejszej wilgotności podłoża niż grzyby polowe [9].

Zawartość mikotoksyn jest ważnym wskaźnikiem jakości ziarna zbóż, produktów spożywczych i pasz. Najważniejszych pod względem ekonomicznym i toksykologicznym w skali europejskiej i światowej jest pięć mikotoksyn: aflatoksyna B₁, ochratoksyna A, deoksyniwalenol (DON), zearalenon (ZEN) i fumonizyna B₁. Aflatoksyna B₁ i jej pochodne zanieczyszczają importowane arachidy, śrutę arachidową i śrutę innych roślin oleistych. Ochratoksyna A jest metabolitem wytwarzanym w ziarnie zbóż po żniwach, przez grzyby saprofityczne rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, w warunkach nieprawidłowego przechowywania ziarna. Deoksyniwalenol, zearalenon i ich pochodne są wytwarzane przez patogeniczne gatunki *Fusarium*, porażające kłosa i ziarniaki zbóż drobnoziarnistych i kolby kukurydzy we wszystkich strefach klimatycznych. Fumonizyna B₁ jest bardzo częstym zanieczyszczeniem ziarna kukurydzy w klimacie subtropikalnym [1].

Liczba zarodników grzybów w gramie surowca lub produktu jest wymiernym wskaźnikiem jakości, szczególnie ziarna zbóż i mieszanek paszowych sypkich i granulowanych. Ocenia się, że w Polsce mikotoksyny powodują corocznie zniszczenie lub pogorszenie jakości około 20-25% zbóż, a co za tym idzie straty w produkcji zwierzęcej. Skarmianie pasz zawierających mikotoksyny może wywoływać u zwierząt natychmiastowy skutek, prowadząc do śmierci w ciągu kilku godzin lub dni – mówi się wówczas o toksyczności ostrej, może również mieć skutki przewlekłe. Szkodliwość mikotoksyn polega głównie na ich działaniu mutagennym, kancerogennym (głównie w stosunku do nerek i wątroby), teratogennym, estrogennym i immunosupresyjnym. Generalnie, najbardziej odporne na działanie mikotoksyn są przeżuwacze, ze względu na detoksykacyjne zdolności mikroflory żwacza, pośrednie miejsce zajmuje drób, najbardziej wrażliwe są natomiast świnię i króliki.

Polskie ustawodawstwo paszowe (Rozporządzenie MRiRW z dnia 6 lutego 2012 r. w sprawie zawartości substancji niepożądanych w paszach), w wykazie maksymalnych zawartości substancji o niepożądanym wpływie na zwierzęta, uwzględnia wyłącznie aflatoksynę B₁, która z reguły nie występuje w materiałach paszowych produkowanych w naszym klimacie. Przegląda-

jąc literaturę zagraniczną, znaleziono pracę podającą dopuszczalne normy mikotoksyn w mieszankach paszowych dla królików. Według Mézesa i Balogha [6] wynoszą one: aflatoksyny – 0,02 mg/kg, ochratoksyna A – 5,00 mg/kg, deoksyniwalenol (DON) – 5,00 mg/kg, zearalenon (ZEN) – 0,50 mg/kg, fumonizyny B₁+B₂ – 5,00 mg/kg.

Gajęcka i wsp. [3] podają, że czynnikami decydującymi o stopniu zatrucia zwierząt mikotoksynami pobieranymi wraz z paszą są: gatunek, forma działania związku, ich biotransformacja w organizmie i mechanizmy obronne, stąd trudno jednoznacznie określić toksyczny poziom. Mikotoksyny są na ogół lipofilne i dlatego mają skłonność do odkładania się we frakcjach tłuszczowych roślin i zwierząt. Skarmianie królikami pasz porażonych mikotoksynami stwarza duże zagrożenie nie tylko dla samych zwierząt, ale i dla konsumentów ich mięsa. Spożywanie produktów wysoko zanieczyszczonych toksynami może prowadzić do różnego rodzaju zatruc, natomiast długotrwałe narażenie na niskie stężenia mikotoksyn zwiększa zachorowalność na nowotwory. Najbardziej wrażliwe na działanie mikotoksyn są płuca, układ pokarmowy, łożysko i gruczoł mlekowy.

W Polsce najczęściej obserwuje się występowanie dwóch mikotoksyn: deoksyniwalenolu i zearalenonu. Deoksyniwalenol zmniejsza pobieranie pokarmu (dając uczucie sytości), w większym stężeniu powoduje biegunkę, obniża odporność i zmniejsza przyrosty masy ciała zwierząt. Jak podaje Mézes [5], biegunki u królików bardzo często mają przyczynę w skażeniu paszy deoksyniwalenolem. Jego działanie najszybciej ujawnia się u młodych zwierząt, u których występują zmiany w obrębie ścian żołądka, stany zapalne jelit, obniżenie α-globulin we krwi oraz powiększenie wątroby [8]. Ostre efekty toksyczne występują tylko wyjątkowo, natomiast długotrwałe narażenie na niskie stężenia tej mikotoksyny ma miejsce dość często i może powodować różne przewlekłe choroby.

Pełnoporcjowe mieszanki paszowe, w których składzie znajdują się ziarna zbóż skażonych zearalenonem mogą być przyczyną zatruc i chorób zwierząt hodowlanych ze względu nie tylko na silne właściwości estrogenowe tej mikotoksyny [2], ale również na jej hepatotoksyczność [4]. Działanie zearalenonu zbliżone jest do hormonu płciowego. Stężenie w paszy powyżej 1 ppm wywołuje zaburzenia w cyklu rozrodczym. Może prowadzić do zmniejszenia masy płodów, poronień, bezpłodności, a także powodować uszkodzenia organów rodnych. Potwierdzono naukowo estrogenne działanie zearalenonu powodujące bezpłodność u świń (zarówno macior, jak i knurów) i bydła, którym podawano pasze zawierające zearalenon na poziomie od 6,8 do 14,0 mg/kg. U loch występowały anomalie w drogach rodnych, obserwowano mniej liczne mioty, często prosięta rodziły się martwe. Oddziałując z receptorami estrogenowymi, zearalenon ma właściwości kancerogenne, wykazuje także toksyczne działanie na komórki wątroby.

W ostatnich latach na polskim rynku paszowym pojawiły się wywary zbożowe, jako produkt uboczny produkcji etanolu paliwowego. Obecnie istnieje wiele oczyszczalni wywarów płynnych, gdzie poprzez zagęszczenie, wirowanie i suszenie otrzymuje się suszony wywar gorzelniany (DDGS), chętnie wykorzystywany jako składnik mieszanek paszowych dla różnych gatunków zwierząt. Niestety wykorzystanie paszowe wywaru wiąże się z ryzykiem obecności w nim toksyn pleśniowych. Ważna jest zatem jakość surowca wyjściowego, ponieważ podczas procesu fermentacji mikotoksyny przechodzą w całości do wywaru, w którym ich stężenie rośnie około 3-krotnie. Z tego powodu, używanie do produkcji etanolu ziaren kukurydzy czy pszenicy porażonych grzybami, wyklucza stosowanie wytworzonego wywaru jako paszy dla zwierząt gospodarskich, a już w szczególności dla królików.

W Instytucie Zootechniki PIB prowadzono badania dotyczące możliwości wykorzystania w żywieniu królików suszonego wywaru kukurydzianego. Zwierzęta żywiono pełnoporcjową mie-

szańką paszową z 0, 5 lub 10% udziałem DDGS. Stado podstawowe podzielono na dwie grupy, prowadząc na jednej badania dotyczące wpływu skarmiania mieszanek na wyniki rozrodu (trzy kolejne mioty samic), na drugiej natomiast badania wzrostowe królicząt od urodzenia do 90. dnia życia.

Przed sporządzeniem mieszanek paszowych oznaczono zawartość mikotoksyn w suszonym wywarze kukurydzianym. Nie stwierdzono aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂, wykazano natomiast obecność deoksyniwalenolu (4602 ppb), zearalenonu (444 ppb), fumonizyny B₁ i B₂ (odpowiednio 51,6 ppb i 29,4 ppb), toksyny HT-2 (47,8 ppb) i T-2 (39,8 ppb), niwalenolu (24,2 ppb) i ochratoksyny A (0,57 ppb).

W czasie odchowu młodych przy matkach (do 35. dnia życia) nie obserwowano żadnych różnic w przyrostach pomiędzy grupami. Jednak króliczeta mieszanek paszową z DDGS zaczęły pobierać dopiero około 20.-21. dnia życia (wcześniej jedynie mleko matki), uzupełniając ją mlekiem matki i słomą ze ściółki. Po odsadzeniu, u królicząt z grupy otrzymującej mieszanek paszową z 10% DDGS stwierdzono brak łaknienia, liczne biegunki, a w konsekwencji znaczne obniżenie masy ciała i wysoki procent padnięć. Sekcja padłych sztuk wykazała stany zapalne jelit i powiększenie wątroby. W 90. dniu życia od pozostałych w doświadczeniu zwierząt pobrano krew, w celu oznaczenia wartości ALT i AST i obliczenia tzw. wskaźnika de Ritisa (stosunek aktywności AST/ALT), który u zdrowych zwierząt powinien być wyższy od jedności. W grupie otrzymującej 10% DDGS w mieszance paszowej wskaźnik ten wynosił 0,89, co świadczy o chorobach miększu wątroby, spowodowanych prawdopodobnie zbyt wysokim poziomem deoksyniwalenolu w paszy. Należy również zaznaczyć, że pasze wykorzystywane w doświadczeniu przygotowywane były w odstępach 2-miesięcznych, tak więc króliczeta otrzymywały mieszanek, która była już jakiś czas przechowywana w paszarce, gdzie mimo zoptymalizowanych warunków magazynowania mogło dojść do znacznego zwiększenia ilości mikotoksyn.

Wyniki rozrodu dla pierwszego miotu samic w grupie otrzymującej 10% dodatek suszonego wywaru kukurydzianego były porównywalne z pozostałymi grupami, jednak zwierzęta zostały pokryte w dniu, kiedy rozpoczęto podawanie paszy doświadczalnej, stąd ciąża mogła rozwijać się prawidłowo. W drugim i trzecim miocie procent samic skutecznie pokrytych (dwa kolejne krycia w odstępie godzinny) był już znacznie niższy (60%). Jak wspomniano, działanie zearalenonu jest zbliżone do hormonu płciowego i może powodować zaburzenia w cyklu rozrodczym. Obremski i wsp. [7] opisali przypadek mikotoksykozy zearalenowej królików, występującej na niektórych polskich fermach w 2003 roku. Problem dotyczył zaburzeń w rozrodzie występujących u 70% samic na fermach. W pobranych próbkach krwi oznaczono poziom ZEN, który kształtował się na poziomie od 0,5 do 4,6 ng/ml. W wycinkach wątroby poziom ZEN wynosił od 60 do 183 ng/g. Osłabione zatruciem króliki, u których doszło do uszkodzenia wielu narządów, były w słabej kondycji i wykazywały zaburzenia w rozrodzie.

Przeprowadzone badania wykazały, że 10% udział w mieszance paszowej DDGS, okazał się niebezpieczny dla królików ze względu na wysoki poziom mikotoksyn w zakupionym wywarze i wyraźnie pogorszył wyniki produkcyjne. Konieczne zatem wydaje się badanie wywarów stosowanych dla tej grupy zwierząt pod kątem obecności mikotoksyn, a przede wszystkim określenie ich bezpiecznego poziomu dla królików.

Literatura: 1. **Chełkowski J.**, 2013 – Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy. www.cropnet.pl/mycotoxin 2. **Dutton M.F., Kinsey A.**, 1996 – J. Anim. Sci. 26, 53-57. 3. **Gajęcka M, Zielonka Ł., Obremski K., Gajęcki M.**, 2008 – Post. Nauk Roln. 2, 75-84. 4. **Jana B., Skwarski R.**, 1998 – Med. Weter. 54, 667-670. 5. **Mézes M.**, 2008 – World Rabbit Congress, Verona, 491-505. 6. **Mézes M., Balogh K.**, 2009 – World Rabbit Sci. 17, 53-62. 7. **Obremski K., Gajęcki M., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Zwierzchowski W., Zielonka Ł., Mikołajczyk A., Siemionek J.**, 2005 – Med. Weter. 61 (4), 458-461. 8. **Selwet M.**, 2010 – Wiad. Zoot. 1, 9-13. 9. **Wróbel B.**, 2014 – Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie 14, 3 (47), 159-176.

Wykorzystanie laseroterapii w leczeniu schorzeń dermatologicznych koni

**Magdalena Łuczyńska, Zbigniew Jaworski,
Karolina Maciejko**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Biostymulacja laserowa jest dziedziną fizykoterapii wykorzystującą sztucznie wygenerowane promienie światła do leczenia ludzi i zwierząt. Jest to popularna metoda leczenia ludzi, rzadko natomiast jest stosowana u zwierząt. Wielu lekarzy weterynarii lekceważy możliwości laseroterapii i nie wierzy w jej efekty. Tym bardziej, że koszt zakupu dobrego sprzętu jest dość wysoki, a zabiegi należy przeprowadzać systematycznie, co dodatkowo zniechęca zarówno lekarzy weterynarii, jak i właścicieli zwierząt. Laseroterapia mogłaby być jednak dobrą alternatywą dla chorób, na które nie ma skutecznego leku, gdy leczenie jest zbyt kosztowne lub gdy zalecany jest zabieg chirurgiczny.

Zadaniem naświetlania laserem jest pobudzenie procesów tkankowych, nie powodując ich uszkodzenia [26]. Dzięki bezpo-

średniemu oddziaływaniu światła dochodzi do zmian procesów utleniania i redukcji w cytoplazmie komórkowej oraz mitochondriach. Biostymulacja laserowa powoduje więc wzmożenie procesów tkankowych, regeneracji oraz aktywności immunologicznej [3, 21]. Najważniejszym parametrem w biostymulacji laserowej jest dawka, czyli ilość energii świetlnej, jaką przekazuje się skórze w miejscu wystąpienia schorzenia bądź w jego pobliżu. Istotny jest również czas, ponieważ im dłużej trwa naświetlanie, tym większa będzie dawka. Producenci laserów zwykle zamieszczają w instrukcji obsługi zalecane dawki. Umownie ustalono, że dawki większe stosuje się w chorobach przewlekłych, natomiast mniejsze w stanach ostrych. Dawka na jeden dzień nie powinna jednak przekraczać 200 J/cm² [10, 21].

Zabieg biostymulacji laserowej można przeprowadzić dwoma sposobami: stabilnie i labilnie. Metodą stabilną posługujemy się przy napromienianiu miejscowym na małych powierzchniach. Labilny rodzaj polega na poruszaniu głowicą lasera nad miejscem zabiegu [22]. Wyróżnia się dodatkowo techniki kontaktowe i bezkontaktowe. Technika kontaktowa polega na napromienianiu miejscowym przy lekkim dociskaniu głowicy lasera do skóry. Zabiegi bezkontaktowe zwykle stosuje się na rany otwarte czy inne zmienione miejsca, których lepiej nie dotykać ze względu na ich bolesność i higienę [21, 24].

Wskazań do biostymulacji laserowej jest bardzo dużo i nie wszystkie są dobrze poznane. Zwykle laseroterapia zalecana jest przy bólach przewlekłych i ostrych. Dobre wyniki uzyskuje się przy naświetlaniu ran, w celu przyspieszenia gojenia, oraz