

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**  
**Katedra za ishranu i botaniku**

**Darko Stefanović**

Doktor veterinarske medicine

**Ispitivanje efikasnosti višekomponentnog  
preparata za detoksikaciju u preveniranju štetnih  
efekata aflatoksina B<sub>1</sub> i T-2 toksina dodatih u  
hranu brojlera**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2024.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
**Department of Nutrition and Botany**

**Darko Stefanović**

Doctor of Veterinary Medicine

**Evaluation of the efficacy of multicomponent  
detoxification agent in the prevention of  
detrimental effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and T-2 toxin  
added in broiled feed**

**PhD Theses**

**Belgrade, 2024**

**MENTOR 1:**

**Dr Jelena Nedeljković-Trailović, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za ishranu i botaniku

**MENTOR 2**

**Dr Mirjana Milovanović, vanredni profesor**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za farmakologiju i toksikologiju

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Darko Marinković, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za patologiju

**Dr Dragoljub Jovanović, viši naučni saradnik**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za ishranu i botaniku

**Dr Srđan Stefanović, viši naučni saradnik**

Institut za higijenu i tehnologiju mesa

**Datum odbrane doktorske disertacije**

## Kratak sadržaj

Cilj ove disertacije je bio da se u *in vivo* uslovima ispita efikasnost multikomponentnog preparata (MR) za detoksikaciju mikotoksina, kao i da se prikaže mogućnost u ublažavanju štetnih efekata AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina pojedinačno ili u kombinaciji, uticaj istih na zdravstveno stanje, proizvodne rezultate, patohistološke promene u tkivima, kao i prisustvo rezidua ovih mikotoksina u tkivima brojlera.

*In vivo* ispitivanja izvršena su na ukupno 96 brojlera podeljenih u 8 grupa. E-I grupa dobijala je hranu sa 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane. E-II grupa dobijala je hranu sa 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% ispitivanog multikomponentnog preparata za detoksifikaciju mikotoksina (MR). E-III grupa dobijala je hranu sa 0,5 mg/kg T-2 toksina, E-IV grupa dobijala hranu sa 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR. E-V grupa dobijala je hranom kombinaciju 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina, E-VI grupa dobijala je hranom kombinaciju 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR. Kontrolna grupa (K), dobijala je hranu bez dodataka tokom celog ogleada. MR grupa dobijala je hranom 0,2% preparata MR. Brojleri su mereni nedeljno, dnevno je beležena uneta količina hrane. Iz ovih podataka izračunavan je prirast i koeficijent konverzije (KK). Nakon šest nedelja brojleri su žrtvovani, a zatim su uzeti uzorci duodenuma, jetre, srca i *Burze Fabricii* (BF) za patohistološka ispitivanja, kao i uzorci grudne muskulature i jetre za ispitivanje prisustva rezidua AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina kao i njihovih metabolita (AfM<sub>1</sub>, HT-2 toksin, T-2 triol i T-2 tetraol).

Tokom celog ogleada najlošije proizvodne rezultate ostvarili su brojleri E-V i E-VI grupe, kao i brojleri E-I i E-III grupe. Brojleri E-II i E-IV grupe koji su hranom pored toksina dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju MR imali su bolje proizvodne rezultate, ali do kraja ogleada nisu dostigli TM kontrolnih grupa. Najviše TM ostvarili su brojleri grupe koja je uz komercijalnu hranu dobijala i 0,2% preparata MR.

Kod brojlera E-I, E-III i E-V grupa, detektovane su PH promene u duodenumu u vidu hiperemije i hemoragije enterocita, atrofije crevnih resica, umnožavanja peharastih ćelija crevnih resica, kao i kariopiknoze u Liberkinijevim kriptama. Promene u jetri zabeležene su u vidu mutnog bubrenja, vakuolarne degeneracije i nekroze, a takođe, je u žučnim kanalima detektovan deskvamativni holangitis i periholangitis dok je u intersticijmu jetre zabeležena periportalna fibroza. Promene u ćelijama srčanog mišića detektovane su u vidu degeneracije, infiltracija miokardiocita mononuklearima i hemoragije, dok se u ćelijama limfnih folikula BF zapažaju nekroza i apoptoza.

Rezidue AfB<sub>1</sub> detektovane su kod brojlera E-I grupe u jetri u koncentraciji od 0,235 μg/kg. Kod brojlera E-II grupe takođe su detektovane rezidue AfB<sub>1</sub> ali je detektovana vrednost bila za 51,06% niza u odnosu na E-I grupu. Razlog je pozitivan efekat preparat za detoksikaciju MR.

Dodavanje 0,2% MR u hranu za brojlere samo je delimično ublažilo negativne efekte AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina pojedinačno ili u kombinaciji, na proizvodne rezultate, intezitet patohistoloških promena, kao i koncentraciju rezudua AfB<sub>1</sub> u jetri.

**Ključne reči: AfB<sub>1</sub>, T-2 toksin, preparat MR, brojleri, proizvodni rezultati, patohistološke promene, rezidue mikotoksina**

## Summary

The aim of this dissertation was to examine the effectiveness of multi-component mycotoxin detoxification preparation (MR) in mitigating the adverse effects of AfB<sub>1</sub> and T-2 toxins individually or in combination on health, production results, pathohistological changes in tissues and the presence of residues of these mycotoxins in broiler tissues.

*In vivo* studies were conducted on a total number of 96 broilers divided into 8 groups. The E-I group received feed with 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub>, the E-II group received feed with 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> with the addition of 0,2% of the investigated new multi-component preparation for mycotoxin detoxification (MR). E-III group received feed with 0,5 mg/kg T-2 toxin, E-IV group received feed with 0,5 mg/kg T-2 toxin with the addition of 0,2% MR. E-V group received a combination of 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> + 0,5 mg/kg T-2 toxin, E-VI group received a combination of 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> + 0,5 mg/kg T-2 toxin with the addition of 0,2% MR. Control group (K), was feed diet without any additions throughout the study. The MR group received 0,2% of the MR preparation with feed. Broilers were measured weekly, the amount of feed ingested per day was recorded. After six weeks, broilers were sacrificed and then samples of the duodenum, liver, heart, and *Bursa Fabricii* were taken for histopathological examination, as well as samples of the pectoral muscles and liver to examine the residues of AfB<sub>1</sub> and T-2 toxins and their metabolites.

During the entire experiment, the worst production results were achieved by broilers of the E-V and E-VI groups, as well as broilers of the E-I and E-III groups. Broilers of the E-II and E-IV groups, which beside toxins received 0,2% of MR detoxification preparation with feed, had better production results, but by the end of the experiment they did not reach the body mass of the control groups. The highest body mass was achieved by broilers of the group, which, in addition to the commercial feed, also received 0,2% of MR preparation.

In broilers of E-I, E-III and E-V groups, PH changes in the duodenum were detected in the form of hyperemia and hemorrhage of enterocytes, atrophy of the intestinal villi with multiplication of goblet cells of the intestinal villi, as well as karyopycnosis in the crypts of Liberkini. Changes in the liver are in the form of turbid swelling, vacuolar degeneration and necrosis, also desquamative cholangitis and pericholangitis were detected in the bile ducts, while periportal fibrosis was recorded in the interstitial tissue of the liver. Changes in the heart muscle cells are in the form of degeneration, myocardiocyte infiltration by mononuclears and hemorrhages, while hemorrhages, necrosis and apoptosis are observed in *Bursa Fabricii* lymphocyte cells.

AfB<sub>1</sub> residues were detected in broilers of the E-I group in the liver at a concentration of 0,235 mg/kg. In broilers of the E-II group, residues of AfB<sub>1</sub> were also detected, but the concentration was 51,06% lower compared to the E-I group. The reason is the positive effect of the preparation for detoxification MR

The addition of 0,2% MR to broiler feed only partially mitigated the negative effects of AfB<sub>1</sub> and T-2 toxins alone or in combination on production results, the intensity of histopathological changes, and the concentration of AfB<sub>1</sub> residues in the liver.

**Keywords: AfB<sub>1</sub>, T-2 toxin, MR preparation, broilers, production results, histopathological changes, mycotoxin residues**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>3</b>
2.1. AFLATOKSIN B <sub>1</sub> .....	4
2.1.1. Aflatoksini-opšte osobine.....	4
2.1.2. Produkcija i biosinteza AfB <sub>1</sub> .....	6
2.1.3. Metabolizam AfB <sub>1</sub> .....	10
2.1.4. Toksičnost AfB <sub>1</sub> .....	13
2.1.5. Mehanizam dejstva .....	14
2.1.5.1. Imunska toksičnost.....	15
2.1.6. AfB <sub>1</sub> u hranivima i hrani za životinje.....	16
2.1.7. Aflatoksikoza živine .....	19
2.1.8. Uticaj AfB <sub>1</sub> na proizvodne rezultate živine .....	21
2.1.9. Uticaj AfB <sub>1</sub> na histopatološke (HP) promene u jetri, srcu, crevima i BF.....	23
2.1.10. Rezidue AfB <sub>1</sub> .....	24
2.2. T-2 TOKSIN .....	25
2.2.1. T-2 toksin opšte osobine .....	25
2.2.2. Produkcija i biosinteza T-2 toksina .....	26
2.2.3. Metabolizam T-2 toksina .....	26
2.2.4. Toksičnost T-2 toksina .....	28
2.2.5. Mehanizam dejstva .....	29
2.2.6. Teratogenost, karcinogenost i imunska toksičnost T-2 toksina .....	30
2.2.7. T-2 toksikoza živine.....	32
2.2.8. Uticaj T-2 toksina na proizvodne rezultate živine .....	34
2.2.9. Uticaj T-2 toksina na HP promene u jetri, srcu, crevima i BF.....	35
2.2.10. Rezidue T-2 toksina .....	36
2.3. SREDSTVA ZA SMANJENJE KONTAMINACIJE HRANE ZA ŽIVOTINJE MIKOTOKSINIMA.....	37
2.3.1. Efikasnost preparata za detoksifikaciju AfB <sub>1</sub> kod živine.....	39
2.3.2. Efikasnost preparata za detoksifikaciju T-2 toksina kod živine.....	41
2.3.3. Efikasnost preparata za detoksifikaciju AfB <sub>1</sub> i T-2 toksina u kombinaciji kod živine.....	43
<b>3. CILJ I ZADATAK RADA</b> .....	<b>44</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE RADA</b> .....	<b>44</b>
4.1 IN VIVO OGLED .....	45
4.1.1 Izbor materijala .....	45
4.1.2 Držanje i hranjenje eksperimentalnih životinja.....	45
4.1.3 Priprema kontaminirane hrane za ogled.....	46
4.1.4 Preparat za detoksikaciju mikotoksina (MR) korišćen u ogledu .....	47
4.1.5 Formiranje ogleda .....	47
4.2 METODE ISPITIVANJA .....	48
4.2.1 Zdravstveno stanje .....	48
4.2.2 Hemijske analize hrane.....	48
4.2.3 Proizvodni rezultati .....	49
4.2.4 Makroskopski i HP pregled u tkivima brojlera.....	50
4.2.5 Analize prisustva rezidua AfB <sub>1</sub> i T-2 toksina i njihovih metabolita u tkivima brojlera .....	50
4.2.6 Statistička obrada podataka .....	52
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>53</b>
5.1. HEMIJSKI SASTAV SMEŠA .....	53
5.2. OGLED NA BROJLERIMA .....	55
5.2.1. Proizvodni rezultati brojlera .....	55
5.2.2. Zdravstveno stanje brojlera tokom ogleda .....	68



5.2.3. Makroskopske i HP ispitivanja u tkivima brojlera .....	68
5.2.3.1. Makroskopske promene u tkivima brojlera.....	68
5.2.3.2. HP u duodenumu ispitivanih brojlera.....	69
5.2.3.3. HP promene u jetri ispitivanih brojlera.....	71
5.2.3.4. HP promene u srcu ispitivanih brojlera .....	74
5.2.3.5. HP promene u BF ispitivanih brojlera .....	76
5.2.4 Prisustvo rezidua AfB <sub>1</sub> i T-2 toksina i njihovih metabolita u grudnoj muskulaturi i jetri ispitivanih brojlera .....	79
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>81</b>
6.1. PROIZVODNI REZULTATI.....	81
6.1.1. Uticaj AfB <sub>1</sub> i preparata za detoksikaciju (MR) na proizvodne rezultate brojlera.....	81
6.2. HISTOPATOLOŠKA ISPITIVANJA U DUODENUMU ISPITIVANIH BROJLERA .....	83
6.3. HISTOPATOLOŠKE PROMENE U JETRI ISPITIVANIH BROJLERA .....	84
6.4. PATOHISTOLOŠKE PROMENE U SRCU ISPITIVANIH BROJLERA .....	86
6.5. HISTOPATOLOŠKE PROMENE U BF KOD ISPITIVANIH BROJLERA .....	88
<b>7. ZAKLJUČCI: .....</b>	<b>92</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>94</b>

# 1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni metaboliti saprofitskih plesni koji u organizam životinja dospevaju putem kontaminirane hrane. Najčešće vrste plesni koje produkuju mikotoksine pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium* vrste mogu da produkuju različite mikotoksine, i to aflatoksine, ohratoksine, patulin, citrinin, T-2 toksin, HT-2 toksin, fumonizine. Trihotecene produkuju plesni rodova *Fusarium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Trichotecium* i sl.

Svi poremećaji zdravstvenog stanja izazvani toksičnim dejstvom mikotoksina se nazivaju mikotoksikoze. Ozbiljnost ovih oboljenja zavisi od toksičnih efekata samog mikotoksina, unete doze kao i dužine izloženosti njihovom dejstvu.

AfB<sub>1</sub> je čest kontaminant hraniva i hrane za životinje te se iz tog razloga njegov uticaj ogleda u negativnim efektima na zdravstveno stanje, proizvodne rezultate životinja, prisustvo patoanatomskih i patohistoloških promena u organima i tkivima, kao i prisustvu rezidua AfB<sub>1</sub> i njegovih metabolita u namirnicama animalnog porekla (NAP).

T-2 toksin kao najtoksičniji predstavnik trihotecenskih mikotoksina tipa A, čest je zagađivač hraniva i hrane za životinje. Zbog toga može da ispolji negativan uticaj na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate životinja, kao i prisustvo patoanatomskih i patohistoloških promena u organima i tkivima. S obzirom na rapidno metabolisanje rezidua T-2 toksina i njegovih metabolita se retko mogu naći u NAP.

U praksi najviše primenjivan način ublažavanja ili eliminisanja štetnih efekata mikotoksina kroz nutritivni tretman bilo je korišćenje adsorbentnih sredstava. Adsorbenti su supstance koje se ne resorbuju iz creva, a imaju sposobnost fizičkog vezivanja određenih hemijskih supstanci čime sprečavaju njihovu resorpciju. Najčešće se primenjuju neorganski adsorbenti (aktivni ugalj, hidratisani natrijum kalcijum aluminosilikat, bentonit, gline i različiti aluminosilikati - zeoliti). Sve češće se primenjuju i organski adsorbenti a posebno modifikovani manan oligosaharidi izolovani iz unutrašnjeg sloja ćelijskog zida kvasaca koji poseduju izrazitu sposobnost adsorpcije mikotoksina.

Novija istraživanja ukazuju da su se u borbi sa mikotoksinima bolje od adsorbentata pojedinačno, pokazali multikomponentni preparati za detoksikaciju koji obično sadrže neorgansko jezgro (zeolita, bentonita ili dr.) i glukomanane poreklom iz ćelijskog zida kvasaca, ali i mikroorganizme koji imaju sposobnost (biodegradacije mikotoksina), kao i enzime koji mogu da

izvrše hemijsku biotransformaciju molekula mikotoksina do manje toksičnih jedinjenja. U ovakvim formulacijama često mogu biti prisutna pomoćna sredstva kao što su hepatoprotektivi, ali aktivni principi esencijalnih ulja biljka koji imaju potpurnu ulogu u organizmu životinja.

## 2. PREGLED LITERATURE

Mikotoksini su metaboliti saprofitskih plesni nastali u njihovom sekundarnom metabolizmu. Sintetišu ih uglavnom micelijumske strukture plesni. Smatralo se da ova jedinjenja nemaju nikakvu ulogu u rastu i razvoju plesni. Novija istraživanja pokazuju da možda deluju odbijajuće na kompetitivne organizme, bakterije, viruse i insekte u supstratu. Sintetišu se pod povoljnim uslovima sredine od kojih su najznačajniji temperatura, relativna vlažnost vazduha, karakteristike supstrata, broj spora plesni, prisustvo drugih mikroorganizama u supstratu kao i stepen oštećenja supstrata (Afsah-Hejri i sar., 2013).

Sama produkcija mikotoksina nije u direktnoj korelaciji sa razvojem plesni u supstratu (Bhat i sar., 2010). Tako na primer, vrste roda *Fusarium* mogu dobro da rastu na temperaturama od oko 25-30°C bez produkcije mikotoksina, dok se na niskim temperaturama proizvodi izrazito velika količina mikotoksina, uz veoma slab rast samih plesni (Joffe, 1986). Ipak, ukupan broj plesni jedan je od kriterijuma higijenske ispravnosti hrane i hraniva jer može da ukaže na verovatnoću prisustva mikotoksina u hrani.

Vegetativni oblici plesni, imaju mogućnost prodiranja u supstrate i njihovu kolonizaciju. Kada su u pitanju žitarice, kontaminacija je moguća u različitim fazama rasta, i to kako u fazi pre žetve, tako i u fazama nakon žetve, pri obradi i skladištenju žitarica. Loši uslovi žetve, kao i neadekvatno sušenje, pakovanje, transportovanje i skladištenje, pogoduju razvoju plesni i povećavaju rizik od produkcije mikotoksina (Bhat i sar., 2010).

Najčešće vrste plesni koje produkuju mikotoksine pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Afsah-Hejri i sar., 2013). Plesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus* mogu da se razvijaju na višim temperaturama i nižoj aktivnosti vode u supstratu od plesni iz roda *Fusarium* (Bhat i sar., 2010). *Aspergillus* i *Penicillium* vrste mogu da produkuju različite mikotoksine, i to aflatoksine, ohratoksine, patulin, citrinin, ergot alkaloida i ciklopiazonsku kiselinu. Trihotecene produkuju plesni rodova *Fusarium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Trichotecium* i sl. (Afsah-Hejri i sar., 2013).

Prirodna kontaminacija žitarica mikotoksinima obično podrazumeva prisustvo više vrsta mikotoksina istovremeno ali u nižim koncentracijama ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  supstrata). Mikotoksini mogu da deluju sinergistički i da izazovu značajnije toksične efekte, nego pri pojedinačnom delovanju (Afsah-Hejri i sar., 2013). Dokazano je da aflatoksini sinergistički deluju sa određenim trihotecenima, kao što je T-2 toksin (Rodrigues i sar., 2011). Ipak, istovremena pojava više vrsta plesni u supstratu može prouzrokovati antagonizam između različitih vrsta plesni kao i nižom koncentracijom produkovanih mikotoksina.

Kontaminacija hraniva mikotoksinima je značajna sa ekonomskog aspekta. Ekonomski gubici proističu iz smanjenog prinosa kontaminiranih žitarica, smanjene hranljive vrednosti ili neupotrebljivosti žita kontaminiranih mikotoksinima. Sa druge strane suočavamo se sa smanjenom produktivnošću životinja obolelih od mikotoksikoza i visokim troškovima lečenja životinja (Rodrigues i sar., 2011).

Plesni koje imaju sposobnost proizvodnje mikotoksina mogu dovesti do značajnih štetnih efekata po zdravlje ljudi i životinja koji se hrane kontaminiranom hranom (Bhat i sar., 2010). U lancu hrane ljudi, mikotoksini dolaze direktno, kao kontaminanti brojnih namirnica biljnog porekla, kao i zbog prisustva rezidua mikotoksina i njihovih metabolita u hrani životinjskog porekla (Jarvis, 2002).

Svi poremećaji zdravstvenog stanja izazvani toksičnim dejstvom mikotoksina se nazivaju mikotoksikoze (Nelson i sar., 1993). Ozbiljnost ovih oboljenja zavisi od toksičnih efekata samog mikotoksina, doze i dužine izloženosti njihovom dejstvu (Bhat i sar., 2010).

## **2.1. AFLATOKSIN B<sub>1</sub>**

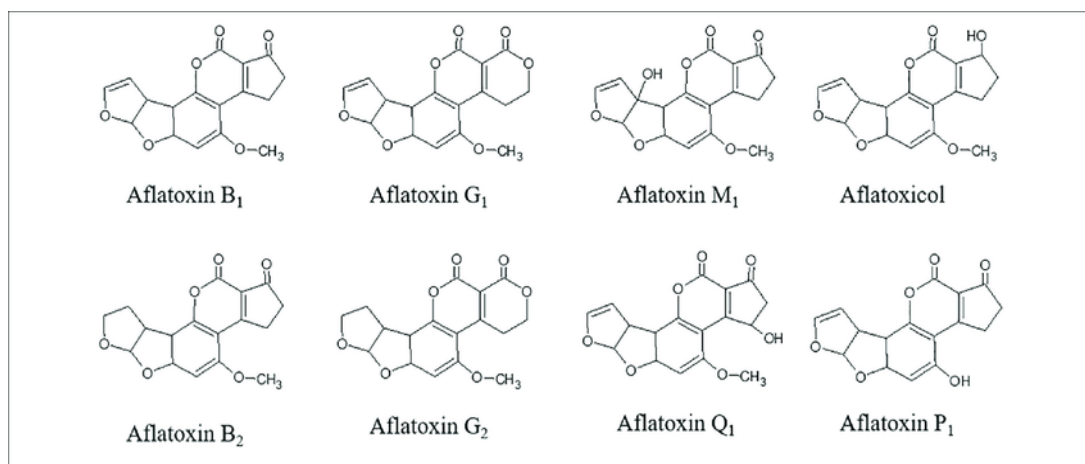
### **2.1.1. Aflatoksini-opšte osobine**

Aflatoksini su visokotoksična jedinjenja koje proizvode plesni roda *Aspergillus*, i to *A. flavus* i *A. parasiticus*. Skoro svi sojevi *A. parasiticus* mogu da sintetišu aflatoksine, dok je kod *A. flavus* produkcija varijabilnija (Moreau, 1979). Aflatoksini se prevashodno nalaze u hrani i hranivima za životinje. Mogu da se pojave u nizu hraniva, kao što su žitarice, začini, semenke, leguminoze, orašasti plodovi, mleko, meso i jaja. Žitarice koje su najčešće kontaminirane aflatoksinima su kukuruz, sirak, proso, pirinač i pšenica, dok su od uljarica i leguminoza najčešće kontaminirani kikiriki, soja, suncokret i seme pamuka (Bhat i sar., 2010).

Poznato je da ovi molekuli uneti u organizam čoveka ili životinja mogu da prouzrokuju toksične efekte (akutne ili hronične), ispolje teratogeno, karcinogeno i mutageno dejstvo (McLean i Dutton, 1995). Uginuće 100.000 ćuraka i oko 20.000 ostale vrste živine od nepoznatog oboljenja (Turkey „X“ disease) u Velikoj Britaniji, 1960. godine prvi put je povezano sa trovanjem mikotoksinima (Asao i sar., 1963; Butler, 1974). Tada je iz kikirikijeve sačme poreklom iz Brazila, sastavne sirovine korišćene za ishranu živine, izolovana plesan *A. flavus* i nekoliko, do tada nepoznatih, jedinjenja koja su veoma intenzivno fluorescirala pod UV zracima. Otkriće ovih jedinjenja, nazvanih aflatoksini, predstavlja prekretnicu i početak intenzivnih proučavanja toksogenih plesni i njihovih sekundarnih metabolita.

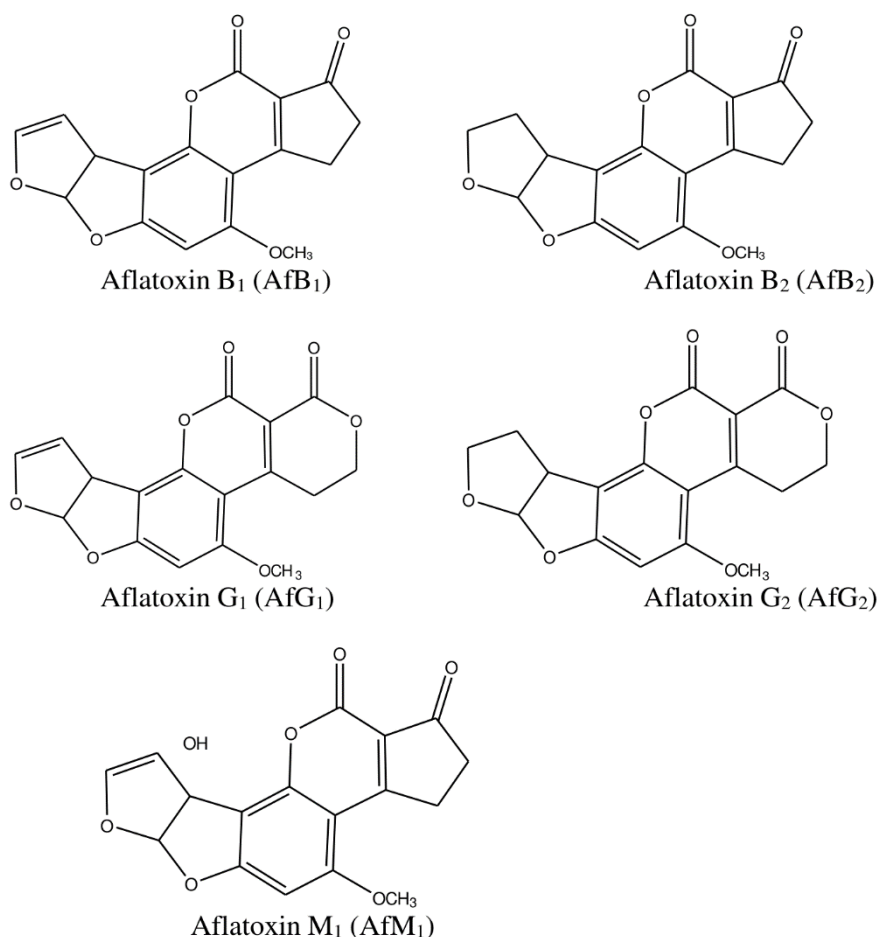
Postoji oko 18 vrsta aflatoksina, od kojih su od najvećeg značaja aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i M<sub>1</sub>. Aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> su direktni sekundarni metaboliti gljivica, dok aflatoksin M<sub>1</sub> nastaje

metabolisanjem aflatoksina B<sub>1</sub> (Bhat i sar., 2010). Slovnne oznake svakog aflatoksina potiču od boje kojom fluoresciraju, pa tako aflatoksini B fluoresciraju plavo (*eng. blue*), dok aflatoksini G – zeleno (*eng. green*). Slika 1. prikazuje hemijsku strukturu aflatoksina i njihovih značajnijih metabolita.



**Slika 1. Hemijska struktura aflatoksina i njihovih značajnijih metabolita**  
(*ResearchGate - [link](#) (Loi i sar., 2020)*)

Na osnovu hemijske strukture i osobina, aflatoksini predstavljaju srodna hemijska jedinjenja bisfuranokumarinskog tipa. Aflatoksini B grupe u strukturi imaju ciklopentanski prsten, dok aflatoksini G grupe umesto njega imaju lakton. Aflatoksini predstavljaju izrazito liposolubilne materije, te se lako prenose kroz ćelijsku membranu. Plesan *A. flavus* sintetiše najčešće aflatoksine B grupe, dok plesni *A. flavus* i *A. parasiticus* sintetišu aflatoksine D grupe (Gürbay i sar., 2010; Weidenbörner, 2001). Strukturne formule pojedinih aflatoksina prikazane su na slici 2.



**Slika 2. Hemijska struktura aflatoksina (EFSA, 2007)**

Izolovani AfB<sub>1</sub> je belo-žuti prah, slabo rastvorljiv u vodi, a rastvorljiv u većini organskih rastvarača umerene polarnosti, kao što su hloroform i metanol, dok je naročito rastvorljiv u dimetil sulfoksidu. Ovaj mikotoksin je po svojoj hemijskoj strukturi bisfurokumarin molekulske mase 312 i zbirne formule C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.

Svi aflatoksini su izuzetno termostabilni i tokom uobičajene termičke obrade hrane (kuvanje, pasterizacija) se ne mogu degradirati ili eliminisati (McLean i Dutton, 1995), što je od velikog značaja sa aspekta bezbednosti i prevencije kontaminacije hrane i hrane za životinje.

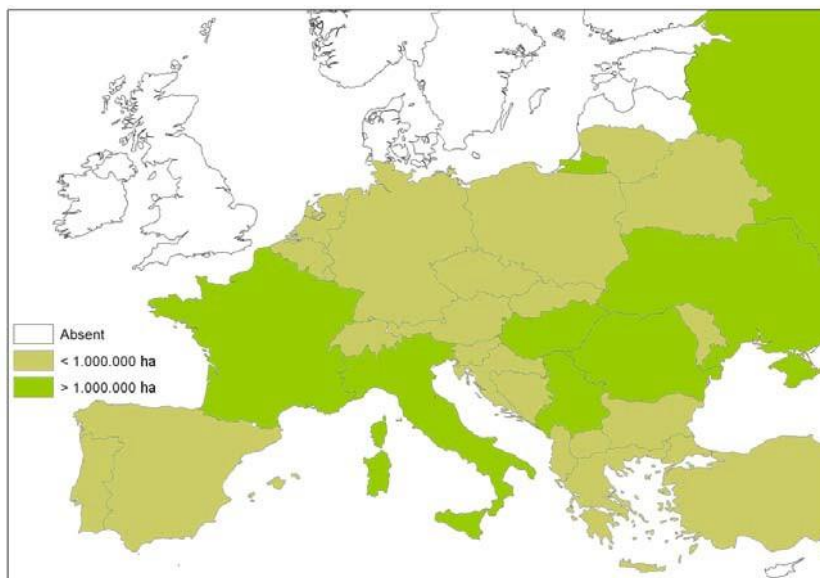
### 2.1.2. Produkcija i biosinteza AfB<sub>1</sub>

Za produkciju AfB<sub>1</sub>, optimalna temperatura je 25-30°C, pri čemu su granične temperature za produkciju 7,5 do 40°C (Schindler i sar., 1967). Aktivnost vode (a<sub>w</sub>) potrebna za produkciju iznosi 0,78 (Ayerst, 1969), a optimalna pH vrednost za rast plesni roda *Aspergillus* iznosi 5,5 (Moreau, 1979).

Formiranje poliketidne osnove AfB<sub>1</sub>, putem polimerizacije acetata i devet malonatnih jedinica, smatra se prvim korakom u sintezi ovog mikotoksina. Ovaj korak se odvija pod dejstvom enzima poliketidna sintetaza, pri čemu dolazi do gubitka CO<sub>2</sub> (Bhatnagar i sar., 1992). Druga hipoteza je da dolazi do sinteze 6-ugljjeničnog heksanoata, pod uticajem masno-kiselinske sintaze, koji se zatim produžava dejstvom poliketidne sintetaze, pri čemu nastaje 20-ugljjenični dekahidrooketid-norantron (Townsend i sar., 1992).

Bez obzira na način formiranja ovog jedinjenja, sledi njegova oksidacija do antrakvinona norsolorinske kiseline (Bhatnagar i sar., 1992). U daljem toku sinteze aflatoksina dolazi do nastanka brojnih jedinjenja, od kojih je verzikolorin A značajan kao prvi molekul koji sadrži dvostruku vezu na poziciji 2,3 u disfuranskom delu. Ova dvostruka veza u molekulu AfB<sub>1</sub> je mesto delovanja mikrozomalnih enzima iz pula citohroma P450 koji dovode do stvaranja visoko reaktivnih epoksida, koji oštećuju DNK i proteine u ćeliji. Za razliku od AfB<sub>1</sub>, molekul AfB<sub>2</sub> ne sadrži ovu dvostruku vezu, te je značajno manje karcinogen (Dvořáčková, 1989).

Najznačajniji način unosa AfB<sub>1</sub> je peroralni, odnosno putem kontaminirane hrane. Jedna od tri najznačajnije žitarice u svetu je kukuruz (Moreno-Martinez i sar., 2011). Proizvodnja kukuruza u Srbiji zauzima oko 40% obradivog zemljišta, tako da se Srbija u poslednjim decenijama smatra važnim proizvođačem i izvoznikom kukuruza u Evropi (Slika 3).



**Slika 3. Zastupljenost kukuruza (EFSA, 2012)**

Sinteza AfB<sub>1</sub> iz aflatoksinogenih plesni je prisutnija u kukuruza koji raste u toplim i vlažnim uslovima u tropskim i subtropskim regionima, za razliku od kukuruza koji raste u regionu sa umerenom klimom (Rustom, 1997). Prisustvo plesni *A. flavus* na kukuruza (Slika 4).





a

b

**Slika 4. *Aspergillus flavus* na a) klipu kukuruza (Schmidt, 2013)**

**b) zrnu kukuruza (Loeffler i Miderson, 2010)**

Postojanje povoljnih uslova može dovesti do rasta, razvoja i razmnožavanje *Aspergillus* plesni i sintezu AfB<sub>1</sub> tokom rasta kukuruza na njivi, zatim tokom žetve, transporta, skladištenja i prerade kukuruza (Bankole i Adebajo, 2003).

Razvojni ciklus *A. flavus* može se podeliti u dve faze. Kolonizacija ostataka biljaka u zemljištu predstavlja prvu fazu, a druga faza je infekcija delova semena i biljke u razvoju. Kod prve faze sklerocija se nalazi na površini zemljišta u prolećnoj sezoni, iz nje se brzo razvija i formira novi inokulum konidija. Inokulum koji su novo formirani putem vetra i insekata mogu se preneti na tek zasejani kukuruz. Zaraženi delovi biljke u periodu rasta kukuruza su sekundarni inokulum konidija, koji može stvarati nove kolonije na nezaraženim kukuruzima (Horn i Dorner, 1998). Prisustvo insekata nije neophodno za kontaminaciju kukuruza AfB<sub>1</sub>, ali sasvim sigurno je da njihovo prisustvo doprinosi povećanju kontaminacije, jer se na mestu gde oštete zrno kolonizacija plesni lakše odvija. Ovakva pojava se vrlo često dovodi u vezu sa postojanjem kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis*) (Widstrom, 1996).

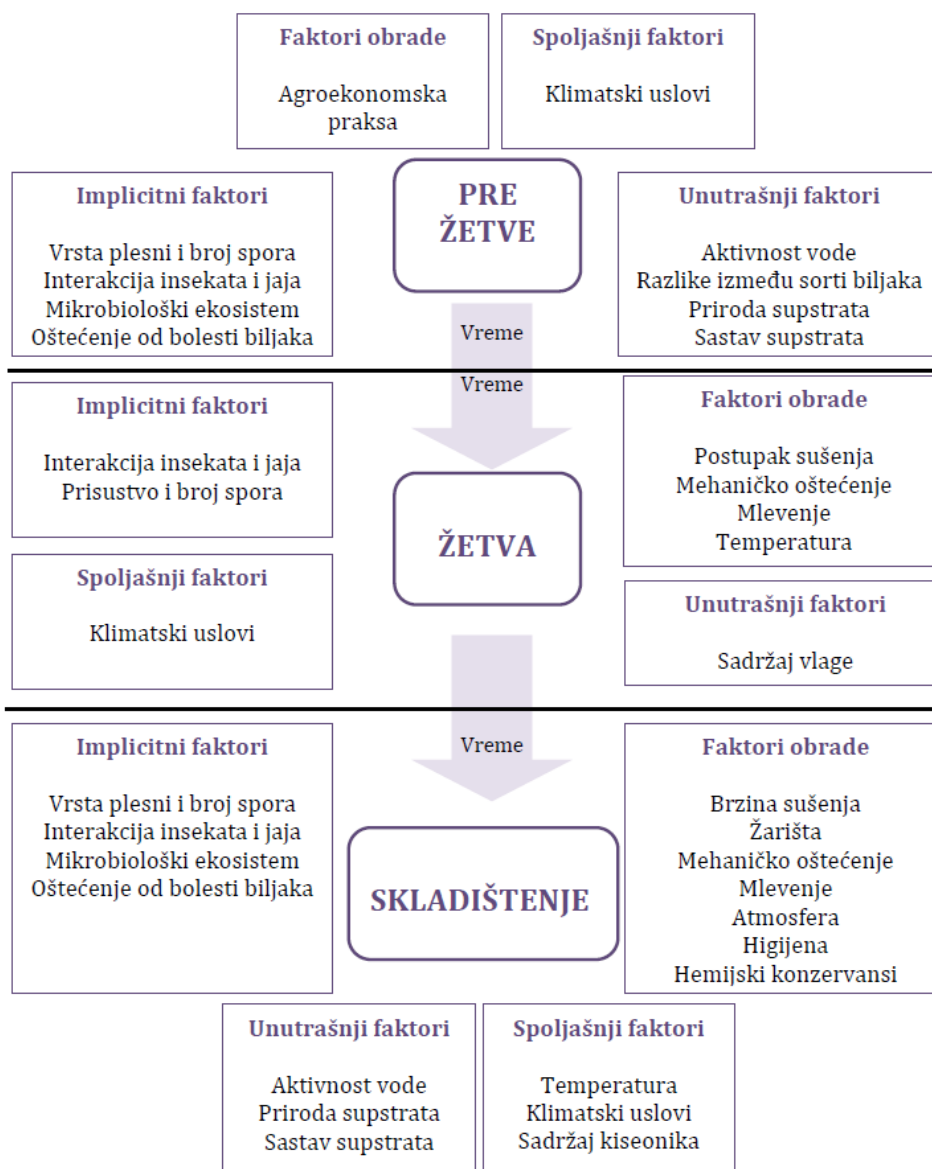
Sinteza AfB<sub>1</sub> će nastupiti ukoliko je na kukuruzu došlo do razvoja *Aspergillus* vrsta, pod uslovom da same plesni imaju genetsku predispoziciju za sintezu AfB<sub>1</sub> i da postoje odgovarajući spoljašnji faktori (Abbas i sar., 2009; Widstrom, 1996).

Pod genetskom predispozicijom smatra se postojanje gena koji omogućavaju sintezu AfB<sub>1</sub>. *A. flavus* poseduje 25 identifikovanih gena grupisanih na 70-kb DNK hromozoma III, čime je omogućena sinteza aflatoksina. Procesom sinteze koji obuhvata oko 23 enzimske reakcije nastaje minimalno 15 međuprodukata (Bhatnagar i sar., 2006; Cary i Calvo, 2008).

Najvažniji spoljašnji uslovi koji mogu uticati na pojavu plesni su temperatura i procenat vlage u supstratu i vazduhu. U područjima u kojima preovladavaju sušni uslovi tj. sa smanjenom količinom

padavina i povišenom temperaturom, značajnija je mogućnost pojave plesni i sinteza AfB<sub>1</sub> u kukuruзу (Payne, 1998). U uslovima postojanja suše, biljka gubi vodu koja je neophodna za sve biohemijske procese. Usled nedostatka vode, biljka se nalazi u stanju stresa što dovodi do smanjene prirodne odbrane i otpornosti biljke, čime se direktno povećava mogućnost za razvoj plesni i sintezu AfB<sub>1</sub> (Gosal i sar., 2009; Moreno-Martinez i sar., 2011). Kao važna stvar koja utiče na razvoj plesni *A. flavus* u sušnim uslovima proizilazi iz poznatog razloga da je razvoj ostalih plesni pri ovim okolnostima skoro onemogućen, tako da se smanjuje prirodna konkurencija između različitih vrsta plesni. *A. flavus* ima mogućnost obrazovanja sklerocije koja može ostati duži vremenski period u tom obliku, tako da može doći do njegovog razvoja i tokom narednih sezona (Klich i sar., 1992). Takođe, sorta kukuruza u znatnoj meri utiče na pojavu AfB<sub>1</sub> u kukuruзу. Ono što je glavni cilj velikog broja istraživanja je stvaranje novih sorti kukuruza koje će biti tolerantnije na sušne uslove i pojavu plesni (Marín i sar., 2001; Moreno-Martinez i sar., 2011).

Svi faktori koji mogu doprineti razvoju plesni i sintezi toksina podeljeni su u četiri grupe (Sinha, 1995): unutrašnji-nutritivni, spoljašnji, faktori prerade i implicitni-mikrobiološki faktori. Svaki od pobrojanih faktora ima odgovarajući uticaj tokom tri faze u kojima može da dođe do razvoja plesni i sinteze toksina: pre žetve, tokom žetve i skladištenja (minimalna sinteza AfB<sub>1</sub>.) Uticaj faktora na razvoj plesni i sintezu toksina (Slika 5).



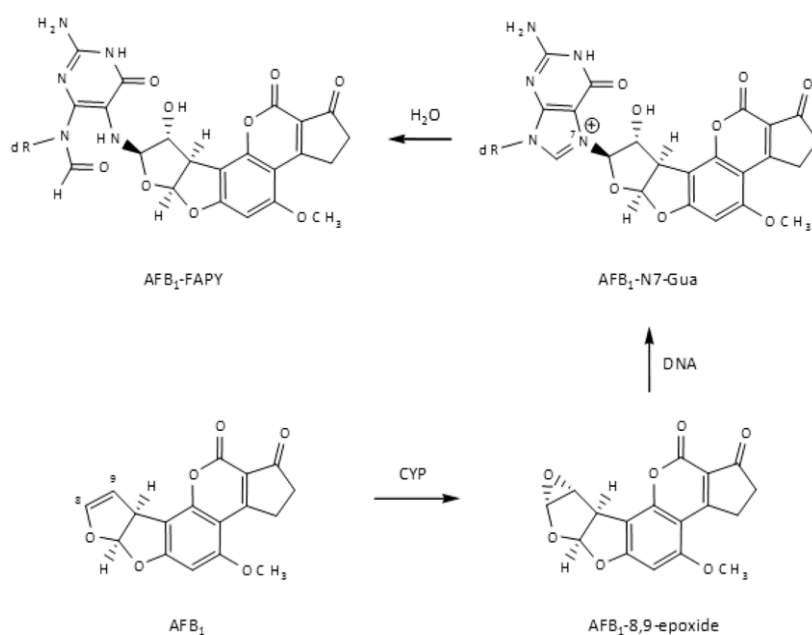
**Slika 5. Interakcija između unutrašnjih i spoljašnjih faktora u lancu proizvodnje kukuruza koji utiču na razvoj plesni i sintezu mikotoksina (Magan i sar., 2004)**

### 2.1.3. Metabolizam AfB<sub>1</sub>

Iako su metabolička sudbina aflatoksina i putevi njihove biotransformacije u organizmu dosta istraženi i opisani, i dalje postoji mnogo praznina u razumevanju regulacije formiranja AfB<sub>1</sub>, interakcije između primarnog i sekundarnog metabolizma plesni, kao i biotičkih i abiotičkih faktora koji rezultiraju određenom produkcijom AfB<sub>1</sub> (Bhatnagar i sar., 2003). Sintaza AfB<sub>1</sub> odgovara poliketidnom tipu, a geni *A. flavus* i *A. parasiticus* odgovorni za biosintetički put su deo klaster gena zajedničkog evolutivnog pretka ovih plesni (Bhatnagar i sar., 2003; Chang, 2003).

Unos AfB<sub>1</sub> u organizam ljudi i životinja se najčešće dešava putem digestivnog trakta, respiratornog sistema i kože. Najznačajniji je peroralni način unošenja, pri čemu se resorpcija odvija u digestivnom traktu. AfB<sub>1</sub> se pojavljuje u krvotoku oko 30 minuta nakon peroralnog unosa, a u jetri posle jednog sata. Nakon resorpcije, AfB<sub>1</sub> se distribuira po organizmu krvotokom, i deponuju u sva meka tkiva i masne depoe. Najviše se nakupljaju u jetri, pogotovo pri dugotrajnom unosu, kao i u bubrezima. Nakupljanje u jetri i bubrezima je značajno, jer ovi organi predstavljaju mesta najizraženije biotransformacije (Leeson i sar., 1995). Kod kokošaka nosilja kojima je jednokratno dat AfB<sub>1</sub> nakon 24h najviša koncentracija toksina je bila zabeležena u jetri, mišićima, pankreasu, koži, masnom tkivu, plućima i slezini (Sawhney i sar., 1973).

U organizmu dolazi do niza biohemijskih reakcija i nastajanja veoma različitih produkata AfB<sub>1</sub>, u zavisnosti od metaboličkih puteva kojima molekul može biti podvrgnut. Veoma je bitno naglasiti da ključni karcinogeni efekti AfB<sub>1</sub> nastaju tokom metabolisanja (Swenson i sar., 1974) i nastanka AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksida mehanizmom oksidacije 8,9-vinil etarske veze (Lizárraga-Paulín i sar., 2011) (Slika 6).



**Slika 6. Biotransformacija AfB<sub>1</sub> u AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksid**

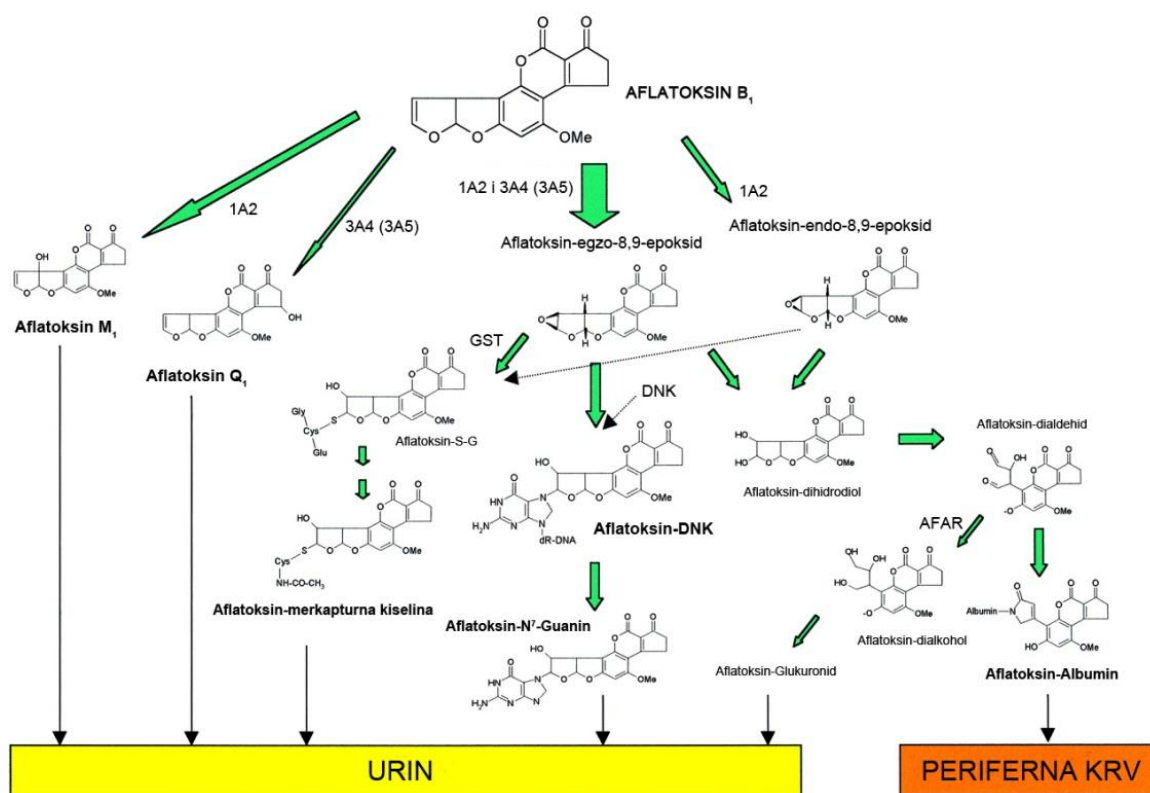
(ResearchGate - [link](#) (Hartwig i sar., 2020))

Metabolički put kojim nastaje ovo jedinjenje otpočinje nakon transporta molekula AfB<sub>1</sub> kroz ćelijsku membranu, nakon čega dolazi do njegove aktivacije mikrozomalnim monooksigenazama u prisustvu citohroma P450, NADPH i molekuskog kiseonika. Proizvod reakcije je visokoreaktivni AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksid. Ovo jedinjenje se vezuje za jedarnu DNK pri čemu dolazi do oštećenja jedra, ili

se vezuje za specifična mesta na endoplazmatičnom retikulumu što rezultira odvajanjem ribozoma sa membrana retikuluma i degradacijom polizoma (Reid i sar., 1982).

AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksid može biti podvrgnut i reakciji hidratacije pri čemu nastaje 8,9-dihidro-8,9-dihidroksi AfB<sub>1</sub>, koji se preko posredničkog molekula AfB<sub>2a</sub> vezuje za bočne lance aminokiselina u proteinima i formira Šifovu bazu (Neal i Colley, 1979). AfB<sub>2a</sub> inkorporisan u strukturne elemente ćelije može izazvati sve efekte koje ispoljava i AfB<sub>1</sub> (Hsieh i sar., 1977).

Takođe, moguća je biotransformacija AfB<sub>1</sub> u polarne molekule AfM<sub>1</sub>, aflatoksin P<sub>1</sub> (AfP<sub>1</sub>) i aflatoksin Q<sub>1</sub> (AfQ<sub>1</sub>) za šta je odgovoran sistem mikrozomalnih monooksigenaza. Navedeni molekuli se usled svoje polarnosti eliminišu lakše putem urina i/ili mleka iz organizma.



Slika 7. Metabolički putevi AfB<sub>1</sub> (Iyer i sar., 1994)

Konjugacija reaktivnog AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksida sa glutationom uz pomoć enzima glutation S-transferaze (GST) smatra se primarnom reakcijom (Degen i Neumann, 1978, 1981; Dohnal i sar., 2014). Konjugat koji se dobije ovom reakcijom, izlučuje se prvenstveno putem žuči. Oslobođeni metaboliti AfB<sub>1</sub> u žuči mogu se reapsorbovati (enterohepatična cirkulacija) (Hsieh i Wong, 1994). Pojedini naučnici su opisali kao mogući put detoksikacije konverziju AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksida putem UDP-glukoronil transferaze-sulfottransferaze (Hayes i sar., 1991).

Efekti koji mogu nastati unošenjem AfB<sub>1</sub> u organizam pojedinih vrsta zavise od razlike puteva aktivacije AfB<sub>1</sub>, mehanizama detoksikacije i eliminacije iz organizma (Hsieh i sar., 1974; Roebuck i sar., 1978). Na osnovu brojnih ispitivanja, dokazano je da rezistentne vrste na AfB<sub>1</sub> (miš, majmun, čovek) eliminišu AFP<sub>1</sub> i AFQ<sub>1</sub> dok to nije slučaj kod prijemčivih vrsta (patka, pacov). Nakon 24 časa, u organizmu ostaje 20-30% od unetog AfB<sub>1</sub> (Pokrovsky i sar., 1972), dok prema drugim podacima 60% AfB<sub>1</sub> i njegovih metabolita se izlučuje putem žuči, a ostatak putem urina i mleka. Kod živine se AfB<sub>1</sub> izlučuju putem urina i fecesa.

#### **2.1.4. Toksičnost AfB<sub>1</sub>**

AfB<sub>1</sub> ispoljava toksične, mutagene, teratogene i karcinogene efekte (Ueno i sar., 1978). LD<sub>50</sub> za AfB<sub>1</sub> iznosi od 0,3-10 mg/kg TM za većinu životinja. Međutim, kod pačića koji se smatraju najprijemčivijom vrstom, LD<sub>50</sub> za AfB<sub>1</sub>, AfG<sub>1</sub>, AfB<sub>2</sub> i AfG<sub>2</sub> iznosi 0,36;0,78;1,70 i 3,44 mg/kg TM (Carnaghan i sar., 1963). Toksičnost pojedinih aflatoksina može se poredati na sledeći način AfB<sub>1</sub>>AfG<sub>1</sub>>AfB<sub>2</sub>>AfG<sub>2</sub>. To je rezultat stvaranja epoksida koji nastaju prilikom oksidacije dvostruke veze na 8-9 položaju. Takođe, može biti i posledica veće reaktivnosti AfB<sub>1</sub> i AfB<sub>2</sub> sa ciklopentanskim prstenom u odnosu na AfG<sub>1</sub> i AfG<sub>2</sub> koji imaju cikloheksanski laktonski prsten (McLean i Dutton, 1995; Wogan, 1966).

Najprijemčivije životinjske vrste su ovce, psi i pacovi, a manje osetljive vrste su majmuni, kokoši i miševi. Ono što je sigurno, u slabo prijemčive životinje ubrajaju se preživari zbog postojanja mikroflore buraga koja ima veliki kapacitet za detoksikaciju, te tokom procesa metabolisanja AfB<sub>1</sub> pretvara u aflatoksikol čime smanjuje ispoljavanje njegovog štetnog dejstva kod preživara (Fink-Gremmels, 2008). Reakcija u kojoj nastaje aflatoksikol je reverzibilna, tako da uvek može da dođe do ponovnog nastajanja AfB<sub>1</sub> (Nakazato i sar., 1990). Važno je napomenuti, da je sam kapacitet koji poseduje mikroflora u buragu ograničen, i zavisi od načina ishrane životinja kao i patoloških stanja koja su vezana za ishranu (metabolička acidoza). Usled pojave ovakvog stanja opada sposobnost mikroflore za eliminaciju toksina, te posledično AfB<sub>1</sub> ulazi u krvotok i dolazi do njegove biotransformacije, hidroksilacije AfB<sub>1</sub> i nastanka AfM<sub>1</sub> (Fink-Gremmels, 2005; Jouany i Diaz, 2005). U tabeli 1. prikazane su vrednosti LD<sub>50</sub> za različite životinjske vrste, odakle se može zapaziti da u najosetljivije vrste spadaju kunić, pačići i svinje dok su pilići nešto manje osetljivi.

**Tabela 1. Srednja smrtna doza (LD<sub>50</sub>) AfB<sub>1</sub> kod različitih životinjskih vrsta**

(A. Yunus i sar., 2011)

Životinjska vrsta	LD <sub>50</sub> (mg/kg TM)
Kunić	0,4
Pačići	2,8
Svinja	3,9
Pas	6,3
Zamorče	10,6
Ovca	12,5
Miš	56,3
Brojleri	72,0
Pacov	73,3

### 2.1.5. Mehanizam dejstva

Funkcionalna oštećenja koja nastaju pod uticajem mikotoksina kao posledica biohemijskih poremećaja, zahvataju na prvom mestu biološke membrane sa posledičnim poremećajem permeabiliteta, dok se u organelama usled poremećaja metaboličkih funkcija javljaju ultrastrukturne promene na nivou ćelija, a onda i promene u strukturi tkiva (Sinovec i sar., 1996). Unošenje veće količine toksina konzumiranjem kontaminirane hrane, dovodi do povećanja stepena i inteziteta patohistoloških alteracija koje potom progrediraju u promene sa zahvatanjem ciljanih organa (Sinovec, 1991).

Molekuli AfB<sub>1</sub> kao liposolubilna jedinjenja, lako prolaze kroz membrane. Po ulasku u ćeliju, AfB<sub>1</sub> i njegovi metaboliti mogu da se vezuju za različite molekule, od kojih su najznačajniji DNK i RNK molekuli, kao i proteini, čime se remeti njihova normalna funkcija. Vezivanje za DNK prekida proces transkripcije, što dovodi do inhibicije sinteze normalnih proteina u ćeliji, što za posledicu ima mutacije i karcinogenezu.

AfB<sub>1</sub> se apsorbuje u duodenumu i stiže do jetre, gde se delovanjem različitih mikrozomalnih enzima iz pula citohrom (P 450) isti aktivira. AfB<sub>1</sub> je genotoksični, hepatokarcinogen za koji se pretpostavlja da dovodi do pojave adenokarcinoma jetre indukujući nastajanje DNK adukata. Nastajanje ovih adukata dovodi do genetskih promena u ciljnim ćelijama, što ima za posledicu oštećenje lanca DNK, oštećenje baza u okviru DNK i oksidativnih oštećenja što može da uzrokuje

nastajanje adenokarcinoma jetre. DNK adukti nastaju hemijskom modifikacijom baza u DNK lancu ili aminokiselina u proteinima (Hamid i sar., 2013).

Približno polovina humanih karcinoma nastaje mutiranjem TP53 gena. Upravo ovo može biti posledica konzumiranja hrane sa AfB<sub>1</sub> (Weng i sar., 2017). Da bi pokazao svoj hepatokarcinogeni efekat AfB<sub>1</sub> mora biti transformisan enzimima iz pula citohroma P450 što prouzrokuje proizvodnju hemijskog intermedijarnog jedinjenja AFBO. Molekul AFBO koji je vrlo nestabilan, reaguje sa nukleinskim kiselinama, proteinima i fosfolipidima što dovodi do različitih genetskih, metaboličkih i poremećaja ćelijske strukture (Rushing i Selim, 2018). Ovo visoko reaktivno genotoksično jedinjenje se vezuje za DNK ćelija jetre i formiraju se adukti DNK odnosno trans-8,9-dihidro-8 (N7 guanil)-9-hidroksi AfB<sub>1</sub> (AfB<sub>1</sub> N7-gua) (Weng i sar., 2017). Među tri oštećenja DNK izazvana AFBO koje su glavni prekursori genotoksičnih i kancerogenih efekata AfB<sub>1</sub>, najmutegeniji je, zbog svog konstantnog oštećenja DNK, AfB<sub>1</sub>-FAPy.

Tokom procesa metabolizma nastali AfB<sub>1</sub> prouzrokuje oštećenje DNK i različitih ćelijskih proteina preko svog toksičnog metabolita AfB<sub>1</sub>-8,9 epoksida (AFBO) (Ates i Ortatatli, 2021; Mungamuri i Mavuduru, 2020) i na taj način remeti metabolizam proteina i lipida stimulišući proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (de Freitas Souza i sar., 2020).

Dokazano je da AfB<sub>1</sub> dovodi do poremećaja urođenog i stečenog imuniteta, pri čemu molekul AFBO stupa u interakciju sa imunokompetentnim ćelijama u organizmu i time utiče na proliferaciju i/ili proizvodnju medijatora imunskog odgovora (Mohsenzadeh i sar., 2016). Ako se ovo oštećenje ne popravi pre replikacije DNK, adukti stupaju u interakciju sa guaninskom bazom i izazivaju mutagene efekte u genu supresora tumora P53 što dovodi do hepatokarcinogeneze.

Detoksikacija visokogenotoksičnog AFBO je suštinski put u cilju sprečavanja nastajanja DNK adukata. Konjugacija AfB<sub>1</sub> sa glutationom i njegovo naknadno izlučivanje se smatra važnim putem detoksikacije kod životinje (Weng i sar., 2017).

#### **2.1.5.1. Imunska toksičnost**

Imunosupresivno delovanje AfB<sub>1</sub> dokazano je imunskim odgovorom kod eksperimentalnih životinja. U zavisnosti od doze AfB<sub>1</sub> dolazi do smanjenja potencijala makrofaga za adherencijom, čime se povećava broj oštećenja u ćelijama a kao posledica se javlja značajna supresija potencijala fagocitoze (Neldon-Ortiz i Qureshi, 1992). Pojedini autori objašnjavaju gubitak TM usled snižavanja koncentracije albumina u serumu i ukupnih proteina (Harvey i sar., 1988; Lindemann i sar., 1993; Southern i Clawson, 1979).



Imunosupresivno dejstvo AfB<sub>1</sub> je dokazano kod laboratorijskih životinja, kao i kod pilića i ćuraka (Sharma, 1993). AfB<sub>1</sub> dovodi do negativnog uticaja na nespecifične komponente imunskog sistema, kao što su komplement, interferon, kao i fagocitna sposobnost makrofaga (Pier i McLoughlin, 1985). Smatra se da su negativan uticaj na komplement, interferon i serumske proteine, posledica oštećenja jetre i inhibicije sinteze proteina. Takođe, AfB<sub>1</sub> dovodi do aplazije timusa i supresije ćelijski posredovanog imuniteta (Pier i McLoughlin, 1985). Unošenje AfB<sub>1</sub> u nižim dozama (0,2-0,5 mg/kg) ne utiče značajno na titar antitela kod pastereloze, salmoneloze i atipične kuge živine. Unošenje viših doza AfB<sub>1</sub> (0,6-10 mg/kg) dovodi do supresije produkcije IgG i IgA antitela (Corrier, 1991).

### **2.1.6. AfB<sub>1</sub> u hranivima i hrani za životinje**

Sve više podataka Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO, 2014) ukazuje da je kontaminacija mikotoksinima na globalnom nivou visoka, te da je preko 25% svetske žetve, skoro svake godine kontaminirano jednim ili više različitih mikotoksina (Eskola i sar., 2020).

AfB<sub>1</sub> je detektovan u mnogim hranivima i hrani za životinje u različitim koncentracijama. Sadržaj AfB<sub>1</sub> u hranivima zavisiće od temperaturnih uslova, vlažnosti vazduha, aktivnosti vode i koncentracije spora toksinogenih plesni. Takođe, zavisi i od primenjenih agrotehničkih mera, prisustva insekata i glodara koji mehanički oštećuju zrno i omogućavaju naseljavanje i infestaciju toksinogenih plesni.

U studiji (Bočarov-Stančić i sar., 2000) dokazano je od 40 do 100 µg/kg AfB<sub>1</sub> u ispitivanim uzorcima kukuruza, dok je u studiji (Mašić i sar., 2003) pokazano da je 10,43% od 585 ispitivanih uzoraka kukuruza bilo kontaminirano AfB<sub>1</sub>.

Tokom ispitivanja koja su vršena u Italiji u periodu od 1982. do 2007. godine analizom je bilo obuhvaćeno 3607 uzoraka kukuruza (Cinti i sar., 2005; Decastelli i sar., 2005; Micco i sar., 1986; Pietri i sar., 2004; Piva i sar., 2006), a najviši sadržaj AfB<sub>1</sub> koji je utvrđen iznosio je 233 µg/kg, dok su se srednje vrednosti kretale u opsegu od 14 do 21 µg/kg. U studiji iz 2003. godine (Piva i sar., 2006) utvrđena je visoka koncentracija AfB<sub>1</sub> sa maksimalnom vrednošću od 155 µg/kg, a verovatno uzrokovano velikom sušom koja je pogodila Italiju 2003. godine.

Geografski položaj Turske, sa prisutnom mediteranskom klimom, omogućava ovoj državi optimalne klimatske uslove u kojima je moguć razvoj plesni koje proizvode AfB<sub>1</sub>. U periodu od 1986. do 2006. godine ispitivanjima je bilo obuhvaćeno 423 uzoraka kukuruza (Alperden i Karaali, 1990; Alptekin i sar., 2009; Giray i sar., 2009; Gursoy i Bicici, 2003; Nizamlıolu i Oguz, 2003; Oruc i sar., 2006; Oruç i sar., 2007; Özyay i Heperkan, 1989), a najviši sadržaj AfB<sub>1</sub> koji je utvrđen iznosio

je 432 µg/kg u 2006. godini (Oruç i sar., 2007). U mediteranskom delu Turske tokom 2002. i 2005. godine zabeležene su najviše vrednosti AfB<sub>1</sub> i iznosile su između 120 i 133 µg/kg pojedinačno (Giray i sar., 2009; Nizamlyolu i Oguz, 2003).

Evropska zemlja koja, takođe, poseduje klimatske predispozicije za kontaminaciju kukuruza AfB<sub>1</sub> je Rumunija, koja je po podacima drugi proizvođač kukuruza u EU (Evropska agencija za bezbednost hrane-EFSA, 2012). Analiza prisustva AfB<sub>1</sub> u kukuruзу obuhvatila je period 1997. do 2004. godine, tom prilikom je analizirano ukupno 95 uzoraka kukuruza (Braicu i sar., 2008; Curtui i sar., 1998; Tabuc i sar., 2009), a najviša zabeležena koncentracija AfB<sub>1</sub> iznosila je 46,4 µg/kg u studiji iz 2009. godine.

U istraživanjima sprovedenim u Iranu (Karami-Osboo i sar., 2012) prijavljeno je 146 pozitivnih uzoraka kukuruza na prisustvo AfB<sub>1</sub> od ukupno 373 analiziranih uzoraka u periodu od 2006-2008. godine, što predstavlja 46,3% ispitivanih uzoraka.

U periodu od jula 2001. do novembra 2002. godine u Brazilu (Sassahara i sar., 2005), utvrđeno je da je od 98 analiziranih uzoraka AfB<sub>1</sub> bilo kontaminirano 26% ispitivanih uzoraka hraniva za životinje, i čak 53% uzoraka potpunih smeša za ishranu životinja.

Studija iz 2006. godine u Americi (Abbas i sar., 2006) obuhvatila je gajenje više eksperimentalnih hibrida kukuruza, uz primenu odgovarajućih agrotehničkih mera, praćena je kontrolisana infestacija sa *A. flavus* plesni. Ukupan sadržaj AfB<sub>1</sub> u svim analiziranim uzorcima kretala se u opsegu od 21 µg/kg do čak 699 µg/kg.

Republika Srbija je 2012. godine pretrpela sušu koja je naročito pogodila poljoprivredne useve. Na osnovu analiza koje su vršene, utvrđeno je prisustvo *A. flavus* na svim ispitivanim uzorcima zrna soje, zatim na kukuruznom zrnu (95,3%), ječmu (65,2%) i suncokretu (57,1%), kao i na zrnu pšenice (45,85%) (Lević i sar., 2013). Izuzetno topli i suvi vremenski uslovi koji su zabeleženi 2012. godine omogućili su razvoj AfB<sub>1</sub>, što je potvrđeno prisustvom AfB<sub>1</sub> u 79% od 700 ispitivanih uzoraka kukuruza (Kos, 2015).

U periodu od 2012. do 2013. godine izvršena je analiza 680 uzoraka kukuruza u Srbiji, čime je utvrđeno da su srednji nivoi kontaminacije AfB<sub>1</sub> iznosili 28,06 µg/kg u regionu Beograda (20,77%), 29,1 µg/kg na području Centralne Srbije (22,29%) i 33,21 µg/kg na teritoriji Vojvodine (29,73%) sa nivoima AfB<sub>1</sub> višim od maksimalno dozvoljenih koncentracija-MDK (Stefanović, 2014).

Ispitivanjem koje je sprovedeno u Srbiji 2013. godine utvrđeno je prisustvo AfB<sub>1</sub> iznad MDK u 67 od ukupno 281 ispitanih uzoraka potpunih smeša za ishranu krava muzara. Koncentracije AfB<sub>1</sub>

bile su iznad MDK u 22% ispitivanih uzoraka kukuruza, dok AfB<sub>1</sub> nije detektovan u senu, silaži kukuruzne biljke,, suncokretovom brašnu i rezancima repe (Spirić i sar., 2015).

Na teritoriji Hrvatske u studiji koja je obuhvatila 633 ispitivanih uzoraka kukuruza u čak 38% koncentracija AfB<sub>1</sub> bila je viša od 81 µg/kg (Pleadin i sar., 2014). Ispitivanjima koja su izvršena u Bosni i Hercegovini tokom 2014-2016. godine od 272 ispitana uzorka silaže, zrna kukuruza ili koncentrovane hrane za životinje u svega 2,57% uzoraka dokazana je vrednost AfB<sub>1</sub> viša od vrednosti MDK.

U poređenju sa ranijim godinama tokom 2016. godine u Holandiji zapaženo je povećanje koncentracije AfB<sub>1</sub> u kukuruzu i proizvodima od kukuruza (Van der Fels-Klerx i sar., 2018). Međutim, ispitivanjima je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije AfB<sub>1</sub> u sirku, semenu suncokreta, kukuruznom glutenu i soji u poređenju sa prethodnim godinama (Van der Fels-Klerx i sar., 2018).

Ispitivanjima sprovedenim tokom 2013-2015. godine u Kini detektovan je najviši sadržaj AfB<sub>1</sub> u soji, niže vrednosti su bile u zrnu kukuruzu i mekinjama, a najniže vrednosti u pšenici (Wu Li i sar., 2016).

MDK AfB<sub>1</sub> propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje („Službeni glasnik RS", br. 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 i 54/2017) (preračunato na 12% vlage) prikazane su u Tabelama 2. i 3.

**Tabela 2. MDK AfB<sub>1</sub> u hranivima i hrani za životinje**

Proizvodi namenjeni za hranu za životinje	MDK (mg/kg) preračunato na 12% vlage
Hraniva	0,03
Dopunske i potpune smeše	0,01
Smeše (dopunske i potpune) za mlečne krave i telad, mlečne ovce i jagnjad, mlečne koze i jarad, prasiće i mladu živinu	0,005
Smeše (dopunske i potpune) za goveda (izuzev muznih krava i teladi), ovce (izuzev mlečnih ovaca i jagnjadi), koze (izuzev mlečnih koza i jaradi), svinje (izuzev prasadi) i živina (izuzev mladih životinja)	0,02

**Tabela 3. Mikrobiološki kriterijumi za plesni u 1g hraniva i hrane za životinje**

Proizvodi namenjeni za hranu za životinje	Broj kvasaca i plesni u 1g
Hraniva biljnog porekla	200.000
Hraniva animalnog porekla	10.000
Smeše za mlade životinje	50.000
Smeše za odrasle životinje	200.000

### 2.1.7. Aflatoksikoza živine

Aflatoksikoza predstavlja akutno ili hronično oboljenje živine koje nastaje p.o. unošenjem AfB<sub>1</sub>. Akutna aflatoksikoza živine nastaje pri konzumiranju hrane kontaminirane visokim dozama AfB<sub>1</sub> i relativno su retke. Dugotrajan unos ovog mikotoksina, čak i pri veoma niskim koncentracijama, može dovesti do poremećaja zdravstvenog stanja i značajnog pada proizvodnih rezultata, pri čemu mogu nastati hronična trovanja.

Značaj AfB<sub>1</sub> je prvi put sagledan 1960. godine, nakon masovnog uginuća ćuraka, pataka i pilića (više od 100.000 jedinki) u Velikoj Britaniji. U to vreme, hemijska struktura, niti uloga aflatoksina još nije bila poznata, te je ova „misteriozna“ bolest nazvana „X - oboljenje ćuraka“ ili hepatična nekroza. Mikološka analiza hrane za životinje, kojom je uginula živina hranjena, potvrdila je prisustvo plesni *A. flavus*. Kasnija analiza tankoslojnom hromatografijom omogućila je samo vizualnu identifikaciju nekoliko jedinjenja koja su pokazivala sposobnost native fluorescencije nakon izlaganja UV spektru.

Svinje i živina su u najvećem riziku od aflatoksikoze, zato što se u najvećoj meri hrane žitaricama, te nemaju predželudačnu mikrofloru koja u određenoj meri ima sposobnost degradacije AfB<sub>1</sub> (Bhat i sar., 2010). U okviru kategorija, mlade životinje su osetljivije od starijih, gravidne od negradivnih. U okviru vrsta živine, najosetljivije su patke, zatim guske, ćurke i fazani, dok su kokoške nosilje najotpornije na dejstvo AfB<sub>1</sub> (Leeson i sar., 1995; Muller i sar., 1970).

Početni simptomi trovanja AfB<sub>1</sub> su anoreksija, gubitak TM, bledilo kože i sluzokoža, slabost nogu i krila, kao i nervni simptomi. Takođe, dolazi i do poremećaja metabolizma lipida i posledično do pojave steatoreje, masne jetre, kao i do snižavanja vrednosti triglicerida, holesterola i fosfolipida u krvi obolelih životinja.

AfB<sub>1</sub> je toksičan za veliki broj životinjskih vrsta, te kod njih dovodi do direktnih ili indirektnih toksičnih efekata, kao što su: imunosupresija, smanjenje prirasta, smanjenje produkcije mleka i jaja. Opisan je mehanizam nastajanja hepatocelularnog karcinoma kod životinja koje su hranom unosile

AfB<sub>1</sub>, zato je Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstala AfB<sub>1</sub> u grupu 1A, (dokazani karcinogen za ljude i životinje, IARC, 2002).

AfB<sub>1</sub> u koncentracije od 0,7 mg/kg hrane značajno je uticao na smanjenje proizvodnih rezultata kod ćuraka, dok ista koncentracija toksina nije imala uticaja na proizvodne rezultate prepelica i brojlera (Lozano i Diaz, 2006).

Kod živine AfB<sub>1</sub> dovodi do poremećaja proizvodnih rezultata, TM, prirasta, konzumacije hrane, konverzije hrane, pigmentacije, randmana trupova na klanicama, produkcije jaja kao i do poremećaja reproduktivnih sposobnosti mužjaka i ženki. Neki od ovih uticaja posledica toksičnog delovanja AfB<sub>1</sub> dok su drugi posledica smanjenog unosa hrane (Calnek i sar., 1997).

U kliničkoj slici obolelih životinja dominiraju anemija, hemoragija, oštećenja jetre, pareze i paralize ekstremiteta, povećanje mortaliteta, a kod najosetljivijih vrsta, primećen je loš imunski odgovor nakon vakcinacije kao i povećana osetljivost na infektivne bolesti (Calnek i sar., 1997).

Osetljivost pilića na uneti AfB<sub>1</sub> zavisice od nekoliko faktora kao što su: rasa, starost, nutritivni status, količina unetog toksina, kapacitet jetre i mikrozomalnih enzima za detoksikaciju.

Akutne aflatoksikoze kod pilića, karakterišu se: krvarenjima u tkivima, nekrozama u jetri i ikterusom. Akutne aflatoksikoze kod živine su retke, i postoji samo nekoliko opisanih slučajeva u literaturi: 1971. u Severnoj Karolini uginulo je 50% jata živine, jer su hranjeni kukuruzom sa 100 mg/kg hrane AfB<sub>1</sub>. Na obdukciji uginulih životinja viđena je bleđa i uvećana jetra, trošne konzistencije sa nekrotičnim žarištima. Takođe, zabeležena su petehijalna krvarenja po tkivima, i intenzivna proliferacija ćelija žučnih kanala (Smith i Hamilton, 1970).

Izveštaj iz Nju Hempšira gde su pilići hranom dobijali 250-500 µg AfB<sub>1</sub>/kg hrane pokazao je uvećanje jetre, smanjenje nivoa hemoglobina i hipoproteinemiju kod intoksiciranih životinja.

U kliničkoj slici kod hroničnih aflatoksikoza dominira smanjen unos vode i hrane, gubitak težine, zaostajanje u rastu, razbarušeno perje, bledilo sluzokoža, ataksija, drhtanje, paraliza nogu, krila i uginuća (Leeson i sar., 1995).

AfB<sub>1</sub> uzrokuje odloženo sazrevanje muških i ženskih polnih ćelija, smanjenje nivoa testosterona u plazmi kod mužjaka, i smanjenje broja folikula kod zrelih kokoši nosilja. AfB<sub>1</sub> dovodi do pojave uvećane i masne jetre, smanjenje produkcije jaja i smanjene izleženosti iz jaja. Utvrđeno je da neposredni pad izleženosti iz jaja proizilazi iz povećanja embrionalnog mortaliteta. Smatra se da smanjena produkcija jaja nastaje zbog inhibicije sinteze i transporta prekursora žumanca u jetri (Dhanasekaran i sar., 2011).

Najveća količina AfB<sub>1</sub> se metaboliše kroz jetru i najvažnije oštećenje jetre izaziva metabolit aflatoksin 8,9 epoksid. Preživari su generalno manje osetljivi na AfB<sub>1</sub> i toksične metabolite u odnosu na monogastrične životinje, zahvaljujući mikroflori buraga koja učestvuje delimično u biotransformaciji aflatoksina u manje toksičan aflatoksikol (Fink-Gremmels, 2008).

Kod životinja otrovanih AfB<sub>1</sub> primećuje se supresija hematopoeze, smanjenje ukupnog broja eritrocita i koncentracije hemoglobina (Huff i sar., 1986). Smanjenje broja eritrocita rezultira hemolitičkom anemijom koja nastaje zbog smanjenja broja zrelih eritrocita u cirkulaciji.

Izloženost AfB<sub>1</sub> rezultira snižavanjem koncentracije ukupne količine serumskih proteina,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  globuline, dok je IgG osetljiviji od IgM (Tung i sar., 1975). AfB<sub>1</sub>, uzrokuje poremećaj zgrušavanja krvi delujući na tromboplastin B, kao i na faktore koagulacije V, VII i X (Doerr i sar., 1976). Takođe, smanjuje nivo protrombina i fibrinogena u plazmi, te posledično produžava vreme koagulacije. Unos AfB<sub>1</sub> hranom dovodi do malapsorptivnog sindroma koji se karakteriše steatorejom, kao i smanjenom količinom žučne soli, pankreasne lipaze, tripsina i amilaze (Osborne i sar., 1982).

### **2.1.8. Uticaj AfB<sub>1</sub> na proizvodne rezultate živine**

AfB<sub>1</sub> pokazuje negativan uticaj na proizvodne rezultate živine u smislu pada TM i prirasta, poremećene konzumacije hrane i povećanja indeksa konverzije hrane. Intenzitet promena zavisiće od doze unetog toksina i dužine izloženosti.

U eksperimentu koji je sproveden na brojlerima koji su sa hranom dobijali 2mg/kg AfB<sub>1</sub> tokom tri nedelje, ova grupa brojlera imala je za 26% nižu TM i 24,32% niži prirast u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa koja je hranom dobijala 2 mg/kg AfB<sub>1</sub> konzumirala je za 3,38% manje hrane u odnosu na kontrolnu grupu brojlera (Solis-Cruz i sar., 2019).

U studiji sprovedenoj na ukupno 300 brojlera koji su sa hranom dobijali 1 mg/kg AfB<sub>1</sub>, zapaženo je značajno smanjenje prirasta i to za 34,82%, konzumacije hrane za 29%, dok je konverzija hrane bila lošija za 8,9% u odnosu na kontrolnu grupu (Rajput i sar., 2017).

(A. W. Yunus i sar., 2011) uočili su negativan efekat AfB<sub>1</sub> na TM živine kada je u AfB<sub>1</sub> bio prisutan u hrani u koncentraciji višoj od 0,5 mg/kg. (Dersjant-Li i sar., 2003) utvrdili su da dodatkom AfB<sub>1</sub> u koncentraciji od 0-10 mg/kg hrane, dovodi do smanjenja proizvodnih rezultata za 5% po svakom unesenom miligramu AfB<sub>1</sub>. (Raju i Devegowda, 2000) uočili su smanjenje TM kod brojlera koji su hranom dobijali 0,3 mg/kg AfB<sub>1</sub> za 21% u odnosu na kontrolnu grupu. (Tedesco i sar., 2004) primetili su smanjenje TM kod brojlera koji su hranom dobijali 0,8 mg/kg AfB<sub>1</sub> za 10% u odnosu na kontrolnu grupu. (Zhao i sar., 2010) zapazili su da je došlo do smanjenja TM brojlera koji su hranom dobijali 1 mg/kg AfB<sub>1</sub> tokom tri nedelje za 10% u odnosu na kontrolnu grupu. (Denli i sar., 2009)

primetili su da je došlo do smanjenja TM brojlera koji su hranom dobijali 1 mg/kg AfB<sub>1</sub> tokom 42 dana za 15% u odnosu na kontrolnu grupu.

(Kana i sar., 2010) su u svojoj studiji opisali negativne efekte veoma niskih doza AfB<sub>1</sub> (0,02 mg/kg) na proizvodne rezultate brojlera. U ogledu koji je trajao tri nedelje, ova doza AfB<sub>1</sub> dovodila je do smanjenja TM brojlera za 5% u odnosu na kontrolnu grupu.

(Tedesco i sar., 2004) su pokazali rezultate svoje studije gde su brojleri dobijali AfB<sub>1</sub> u koncentraciji od 0,8 mg/kg hrane. Nije bilo statistički značajnih razlika između grupe koja je hranom dobijala 0,8 mg/AfB<sub>1</sub>/kg hrane i kontrolne grupe životinja. U periodu između četvrte i pete nedelje ogleda, grupa brojlera koja je dobijala 0,8 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane imala je statički značajno niže vrednosti TM u odnosu na brojlere kontrolne grupe. Takođe, tokom pete i šeste nedelje ogleda konzumacija hrane je bila statistički značajno niža kod grupe koja je dobijala 0,8 mg/kg AfB<sub>1</sub>, i to za 25,6% u odnosu na kontrolnu grupu. KK za ceo ogled iznosila je 2,93 kg kod brojlera koji su hranom dobijali AfB<sub>1</sub>, dok je kontrolna grupa ostvarila značajno bolji KK-2,48 kg u odnosu na grupu koja je hranom dobijala 0,8 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane.

Iz navedenih rezultata, evidentno je da na smanjenje TM brojlera utiču kako koncentracija AfB<sub>1</sub>, tako i dužina izloženosti samom toksinu (A. W. Yunus i sar., 2011).

U eksperimentu koji je trajao 42. dana, 120 jednodnevnih brojlera, bilo je podeljeno u četiri grupe. Prva grupa dobijala komercijalnu hranu bez dodataka,, druga je dobijala 100 µg/kg, treća 200 µg/kg i četvrta grupa je dobijala 400 µg/kg AfB<sub>1</sub>. Na kraju ogleda TM brojlera prve grupe bila je viša za 32,18% u odnosu na četvrtu grupu brojlera. Isto tako, konzumacija hrane je bila viša kod brojlera prve grupe za 23,30% u odnosu na brojlere četvrte grupe. KK hrane kod brojlera prve grupe je iznosio 2,24 dok je kod brojlera četvrte grupe iznosio 2,53 (Alam i sar, 2020).

### **2.1.9. Uticaj AfB<sub>1</sub> na histopatološke (HP) promene u jetri, srcu, crevima i BF**

Kod brojlera koji su hranom dobijali 50 µg AfB<sub>1</sub> po kilogramu hrane 21. dana oglada zapaža se degeneracija jetre u vidu blagog hepatocelularnog edema i masnih promenama u centrolobularnom području, dok se 42. dana zapažaju teži oblici promena u vidu jasnog hepatocelularanog edema u centrolobularnim i srednjim zonama jetre (Magnoli i sar., 2011).

Ogled je sproveden na 120 brojlera ROSS provinijence koji su hranom dobijali 1 mg/kg AfB<sub>1</sub> tokom šest nedelja. Patohistološke promene su opisane u tkivu jetre u vidu vakuolarne degeneracije hepatocita, perilobularno se zapaža infiltracija mononuklearnih ćelija, kao i hiperplazija sa hipertrofijom epitela žučnih kanalića (Denli i sar., 2009). Kod brojlera ROSS provinijence hranjenih sa 1mg/kg AfB<sub>1</sub> zapaža se blaga infiltracija perilobularnih prostora eozinofilima, kao i vaskularna degeneracija uz masne promene u hepatocitima (Ślizewska i sar., 2019).

Brojleri su hranom dobijali 50 i 200 µg/kg AfB<sub>1</sub> tokom 40 dana, Kod brojlera koji su hranom dobijali 50 µg/kg AfB<sub>1</sub> zapažaju se HP promene u jetri u vidu diskretne vakuolarne degeneracije hepatocita i proliferacije žučnih kanala u blizini portnog prostora. Kod grupe brojlera koja je hranom dobijala 200 µg/kg AfB<sub>1</sub> zapaža se prisustvo fokalne nekroze i zapaljenskog ćelijskog infiltrata sa narušenom arhitekturom hepatocita (Tessari i sar., 2006).

Kod brojlera koji su hranom dobijali 100 µg AfB<sub>1</sub>/kg hrane, zapažena je difuzna mikrovakuolarna degeneracija hepatocita. Morfometrijska studija toksičnosti AfB<sub>1</sub> pokazala je toksičan efekat AfB<sub>1</sub> na dubinu kripti i visinu crevnih resica enterocita (Poloni i sar., 2015).

Kod jednodnevnih brojlera koji su 21 dan dobijali hranu sa 0,2 ili 3 mg AfB<sub>1</sub> a zatim 10 dana hranu bez AfB<sub>1</sub>, uočena je pojava vakuolizacije hepatocita i deplecije limfocita u folikulima medule BF. Promenu nisu nestale nakon faze oporavka od tri nedelje. Intenzitet promena bio je povezan sa koncentracijom toksina u hrani. Takođe, primećeno je smanjenje apsolutne mase organa i to jetre, slezine, BF i tireoidne žlezde kod grupe brojlera koja je dobijala višu dozu AfB<sub>1</sub> (Espada i sar., 1992).

U ogledu koji je izveden na 240 brojlera koji su hranom dobijali 0,5 i 1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane primećeno je signifikantno povećanje apsolutne težine jetre, srca i pankreasa i smanjenje apsolutne težine slezine i BF u poređenju sa kontrolnom grupom brojlera. Na makroskopskom pregledu uočeno je da je jetra ptica koje su hranom dobijale 1mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane uvećana, blede-žute boje, trošne konzistencije, a po parenhimu jetre zapažaju se hematomi. U žučnoj kesi primećeno je nakupljanje veće količine guste zelenkaste žuči. U srčanoj muskulaturi viđene su blage degenerativne promene. U digestivnom traktu kod ptica koje su hranom dobijale 0,5 i 1 mg/kg AfB<sub>1</sub> zapaža se kataralni do hemoragično-nekrotični gastroenteritis. U crevima kod brojlera koji su hranom dobijali AfB<sub>1</sub> u



koncentraciji od 0,5 i 1 mg/kg primećene su kataralne promene sa pojačanom aktivnošću peharastih ćelija tokom celog ogleada. Primećena je takođe, hiperplazija kripti epitelnih ćelija i blagi do umereni stepen limfoidne infiltracije unutar ćelija lamine proprije (Lakkawar i sar., 2017).

Brojleri Cobb provinijence hranjeni su hranom koja je sadržala 0,6 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane, dubina kripti ćelija tankog creva bila je signifikantno viša u odnosu na kontrolnu grupu. Visina i površina crevnih resica bile su značajno smanjene kao i broj peharastih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu (Wang i sar., 2018).

#### **2.1.10. Rezidue AfB<sub>1</sub>**

Hrana životinjskog porekla koja potiče od životinja koje su hranjene hranivima kontaminiranim AfB<sub>1</sub>, može sadržati ostatke ovog mikotoksina ili njegovih metabolita. Iako je najdominantniji nalaz AfM<sub>1</sub> u mleku, čak i nakon procesa pasterizacije, ovi mikotoksini se mogu naći i u ostalim proizvodima životinjskog porekla, kao što su jetra, jaja i meso (Kumar i sar., 2017).

Rezidue su pronađene u jajima kokošaka nosilja koje su bile hranjene hranom koja je sadržala više od 3310 µg/kg i 1680 µg/kg AfB<sub>1</sub> toksina tokom 28 dana (Wolzak i sar., 1985). Aflatoksin i/ili njegovi metaboliti su nađeni u svim delovima jajeta najranije 10 časova nakon ovulacije. Nakon 48h koncentracija AfB<sub>1</sub> opada u belancetu, a raste u žumancetu i ljusci (Sawhney i sar., 1973). Jaja kokošaka nosilja hranjenih hranom sa 100-400 µg/kg AfB<sub>1</sub> toksina, sadržala su 0,2-3,3 µg/g ovog toksina (Jacobson i Wiseman, 1974).

Kokoške nosilje hranjene hranom sa 8 µg/kg AfB<sub>1</sub> tokom 7 dana, imale su rezidue AfB<sub>1</sub> u jajima i svim jestivim tkivima, pri čemu je najviša koncentracija bila u jetri i jajnicima. Kokoške nosilje koje su nakon 7 dana ishrane kontaminiranom hranom, dobijale još 7 dana hranu bez AfB<sub>1</sub>, imale su rezidue samo u jajima, a u jestivim tkivima ih nije bilo (Trucksess i sar., 1983).

Kokoške nosilje i brojleri hranjeni tokom dužeg perioda hranom sa 50 µg AfB<sub>1</sub>/kg imali su rezidue ovog toksina u jetri, bubrezima i mišićima, pri čemu je najviša koncentracija zabeležena u jetri (0,6-1,1 µg/kg). Dve nedelje nakon prestanka unošenja kontaminirane hrane, rezidue nisu bile detektovane (Micco i sar., 1988).

U ogledu na brojlerima koji su tokom 7, 14 i 28 dana hranjeni hranom sa 1600, 3200 i 6400 µg/kg AfB<sub>1</sub> primećeno je da su najvišu koncentraciju rezidua u jetri i muskulaturi imali brojleri koji su hranom dobijali 6400 µg/kg AfB<sub>1</sub> i to u koncentracijama 6.97±0.08 ng/g (jetra) i 3.27±0.05 ng/g (muskulatura). Rezidue su detektovane već od drugog dana ogleada (Hussain i sar., 2010).

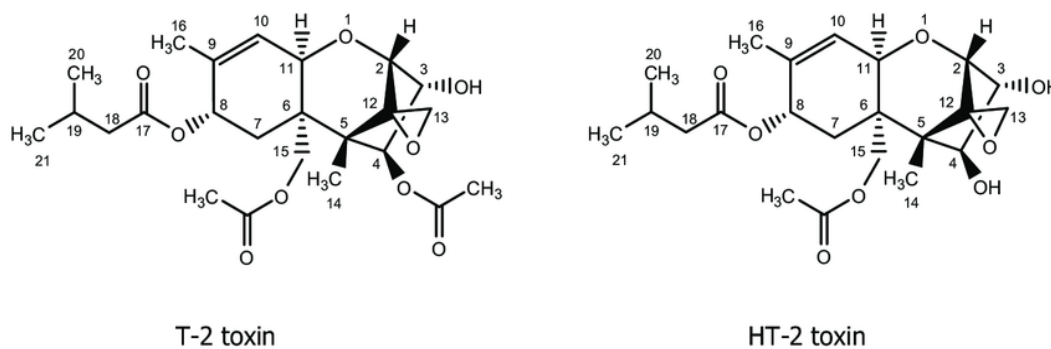
U eksperimentu koji je trajao 42. dana, 120 jednodnevnih brojlera, bilo je podeljeno u četiri grupe. Prva grupa dobijala je komercijalnu hranu bez dodataka, druga je dobijala 100 ng/g, treća je dobijala 200 ng/g i četvrta grupa je dobijala 400 ng/g AfB<sub>1</sub>. Na kraju ogleda rezidue nisu bile detektovane kod brojlera prve grupe. Kod brojlera druge grupe zabeležene rezidue u jetri u koncentraciji od 0,010 ng/g, dok rezidue AfB<sub>1</sub> nisu detektovane u muskulaturi. Kod treće grupe životinja detektovano je prisustvo rezidua u jetri u koncentraciji od 0,091 ng/g i muskulaturi 0,010 ng/g. Kod četvrte grupe brojlera opisano je prisustvo rezidua AfB<sub>1</sub> u jetri u koncentraciji od 0,140 ng/g i muskulaturi od 0,061 ng/g (Alam i sar, 2020).

## 2.2. T-2 TOKSIN

### 2.2.1. T-2 toksin opšte osobine

T-2 toksin je jedan od najznačajnijih mikotoksina, prema učestalosti pojavljivanja i opasnosti koju predstavlja po zdravlje ljudi i životinja i (Adhikari i sar., 2017). Pripada grupi trihotecena, koju čini više od 180 različitih mikotoksina (Mostrom i Raisbeck, 2012). Proizvode ih prevashodno plesni iz roda *Fusarium*, ali i one koje pripadaju rodovima *Trichoderma*, *Trichotecium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* i *Stachybotrys* (Bhat i sar., 2010; Ueno, 1983).

Svi trihoteceni imaju sličnu strukturu, tetraciklični seskviterpenoidni 12, 13– epoksitrihotek-9-enski prsten i 12,13-epoksidni prsten koji je odgovoran za toksikološku aktivnost. Poseduju hemijsku strukturu koju karakteriše hidroksilna (OH) grupa na poziciji C-3, acetiloksi (-OCOCHO) grupe na pozicijama C-4 i C-15, vodonik na poziciji C-7 i estarski vezani izovaleril [OCOCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] grupa na poziciji C-8 (Slika 8).



**Slika 8 - Struktura T-2 toksina**  
(ResearchGate - [link](#) (Knutsen i sar., 2017))

Na osnovu funkcionalnih grupa u molekulu, podeljeni su na tip A (T-2 i HT-2 toksin), tip B (deoksinivalenol i nivalenol), tip C (krotocin, bakarini) i tip D (saratoksin, roridin) (Adhikari i sar., 2017). Trihoteceni iz grupe A su najtoksičniji od svih trihotecenskih mikotoksina (Bhat i sar., 2010).

T-2 toksin je bela, kristalna, optički aktivna supstanca. Nerastvorljiv je u vodi, ali se rastvara u acetonu, etanolu, metanolu, propilen glikolu i drugim organskim rastvaračima. Ovaj toksin je stabilan u spoljašnjoj sredini, te je otporan na niz svetlosnih i temperaturnih opsega, ali se lako deaktivira jakim kiselinama ili bazama (Adhikari i sar., 2017).

### **2.2.2. Produkcija i biosinteza T-2 toksina**

T-2 toksin proizvode plesni roda *Fusarium*, i to *F. tricinctum*, *F. roseum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* i dr. Ove plesni su ubikvitarne i mogu da infestiraju hraniva, kako na polju, tako i u fazi skladištenja. T-2 toksin se sintetise na temperaturi od 0 do 32° C, a maksimalna sinteza se odvija na temperature od 10°C-15°C C (Bouaziz i sar., 2008).

Proces biosinteze molekula započinje ciklizacijom farnezil pirofosfata u hidrokarbon trihodien, uz pomoć enzima trihodien sintetaze (Vedula i sar., 2007). Dalji put u sintezi trihotecena uključuje mnogobrojne reakcije oksigenacije, izomerizacije, ciklizacije i esterifikacije, pri čemu od trihodiena nastaju trihoteceni – diacetoksiscirpenol, T-2 toksin i 3-acetil deoksinivalenol.

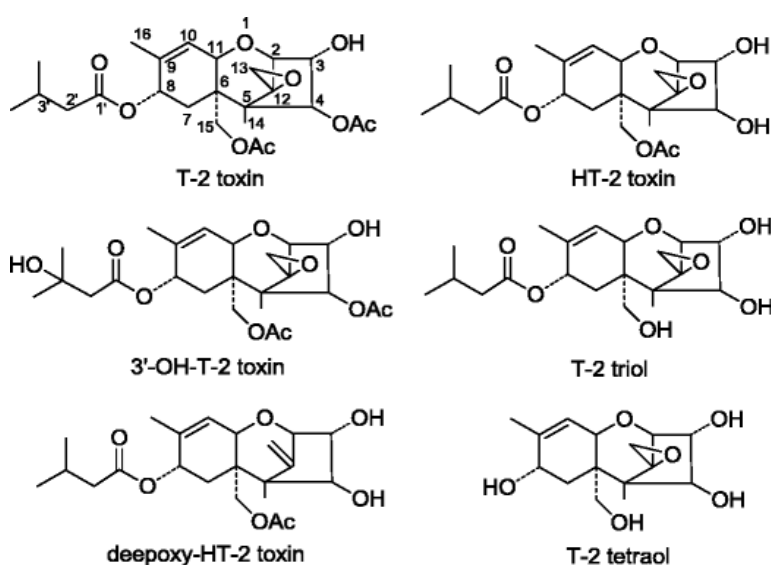
### **2.2.3. Metabolizam T-2 toksina**

Resorpcija trihotecena se dešava na različite načine, uključujući oralni, dermalni i inhalacioni put (Adhikari i sar., 2017). Trovanje T-2 toksinom najčešće nastaje nakon peroralnog unošenja toksina. U velikoj meri se metaboliše već u tankim crevima, te je biološka raspoloživost nepromenjenog T-2 toksina potencijalno veoma niska. Metabolisanjem T-2 toksina u organizmu nastaje HT-2 toksin (Bhat i sar., 2010). Nakon resorpcije toksina dolazi do njegove distribucije po organizmu putem krvi. Toksin i njegovi metaboliti se u organizmu distribuiraju u različita tkiva, zavisno od afiniteta toksina prema tkivima, doze toksina i vrste životinja. (Matsumoto i sar., 1978).

Kod brojlera starih 6 nedelja koji su dobijali T-2 toksin u koncentraciji od 2 mg/kg hrane tokom 5 nedelja, a kojima je zatim jednokratno u voljku aplikovan radioaktivno obeležen T-2 toksin u dozi od 0,5 mg/kg TM, maksimalna koncentracija u većini tkiva bila je zabeležena 4 časa nakon aplikacije, a u mišićima, koži i žuči nakon 12 časova. Posle 48 sati u mišićima i jetri je bilo utvrđeno prisustvo toksina i/ili njegovih metabolita u koncentraciji od 39-40 µg/kg (Chi i sar., 1978).

Metabolička biotransformacija toksina se odvija u velikom broju ćelija, od kojih su najznačajniji hepatociti. Metabolizam T-2 toksina se odvija u dve faze. U prvoj fazi dolazi do formiranja polarnih jedinjenja tokom reakcija saponifikacije, hidroksilacije i deepoksidacije, dok se u drugoj fazi nastali metaboliti T-2 toksina konjuguju sa glukuronskom kiselinom.

Proces saponifikacije T-2 toksina se dešava pomoću enzima karboksilesteraze, koja deacetiliše C4 ostatak T-2 toksina, pri čemu prevashodno nastaje HT-2 toksin. Ovaj metabolit se razlaže dalje reakcijom hidroksilacije do T-2 triola, koji se zatim, u reakciji deepoksidacije, razlaže do T-2 tetraola, pri čemu se gubi toksičnost primarnog jedinjenja (Swanson i sar., 1987). T-2 tetraol i HT-2 toksin se pre eliminacije, kod nekih životinjskih vrsta, konjuguju sa glukuronskom kiselinom (Slika 9).



**Slika 9. Metabolizam T-2 toksina** (Wu i sar., 2012)

Zavisno od vrste životinja, T-2 toksin može da se transformiše u različita jedinjenja. Istraživanja sprovedena na hepatocita brojlera pokazuju da metabolisanjem T-2 toksina nastaje HT-2 toksin, koji se preko 4-deacetylneosolaniola metaboliše u T-2 tetraol (Yoshizawa i sar., 1980). Pored navedenih jedinjenja kao produkt metaboličke biotransformacije T-2 toksina, utvrđeno je prisustvo i različitog broja nepoznatih derivata. Svi metaboliti T-2 toksina su manje toksični od samog T-2 toksina, sa izuzetkom 3–hidroksi T-2 toksina. Na pilećim embrionima, kojima je T-2 toksin ubrizgan u žumančanu kesu, utvrđeno je da je polужivot T-2 toksina bio 48-60h, dok je posle 8-9 dana T-2 toksin bio potpuno metabolisan u T-2 tetraol (Bata i sar., 1983). Ekskrecija toksina i njegovih metabolita se dešava dominantno putem žuči (Bhat i sar., 2010). Brojleri u roku od 48 časova eliminišu skoro čitavu dozu unetog T-2 toksina, bez značajne akumulacije rezidua (Chi i sar., 1978).

Kod brojlera starih 5 nedelja kojima je intraperitonealno aplikovan toksin, rezidue T-2 toksina i njegovih metabolita pronađene su u ekskretima, jetri i plućima, ali nisu pronađene u srcu ili bubrezima (Pandey i sar., 2005; Visconti i Mirocha, 1985).

#### 2.2.4. Toksičnost T-2 toksina

T-2 toksin je veoma toksičan, kako za ljude, tako i za životinje. Trovanje T-2 toksinom kod ljudi se označava kao alimentarna toksična aleukija (ATA) (Adhikari i sar., 2017). Toksični efekti koje kod različitih organizama ispoljava T-2 toksin zavise od brojnih faktora, kao što su način unosa, doza i vreme izlaganja, prisustvo drugih mikotoksina, ali i vrsta, starost, pol kao i kondicija organizma (Hossam, 2013). Najmarkantniji simptomi trovanja kod ljudi su abdominalni bol, mučnina, povraćanje, smanjen apetit, dijareja, vrtoglavica, glavobolja i otežano disanje. Lokalno iritantno dejstvo se ispoljava epitelonekrotičnim efektima, najčešće u usnoj duplji i ostatku digestivnog trakta. Hemoragična dijateza se javlja kao posledica oštećenja zidova krvnih sudova (Stoev i sar., 2010). Hipoplazija kostne srži dovodi do leukopenije i pada imunskih sposobnosti organizma (Bhat i sar., 2010).

Veća toksičnost T-2 toksina u odnosu na druge toksine iz grupe trihotecena posledica je izražene lipofilnosti molekula, koja mu omogućava brži prolazak kroz ćelijsku membranu i pojačava toksično dejstvo. Ovaj toksin ima hidrofilne osobine, te svoje toksične efekte ostvaruje i ugradnjom u lipidne ili proteinske komponente ćelijske membrane, ometajući njenu funkciju. Efekat ometanja funkcije ćelijske membrane je dokazan u *in vitro* uslovima na kulturama ćelija (eritrocitima, mioblastima i fibroblasta) (Coulombe Jr, 1993). U tabeli 4. Tade su vrednosti LD<sub>50</sub> za T-2 toksin kod životinja (Adhikari i sar. 2017) .

**Tabela 4. Srednja smrtna doza (LD<sub>50</sub>) T-2 kod različitih životinjskih vrsta**

Životinjska vrsta	LD <sub>50</sub> (p.o. mg/kg TM)	LD <sub>50</sub> (i.v. mg/kg TM)	LD <sub>50</sub> (i.p. mg/kg TM)
Miševi	10,0	4,2	5,2
Pacovi	3,7	0,9	1,5
Zamorci	-	1-2	1,2
Kokoške nosilje	6,3	-	-
Jednodnevni pilići	5,0	-	-
Svinje	5,0	1,2	-

### 2.2.5. Mehanizam dejstva

Na dejstvo T-2 toksina su najosetljivija tkiva i ćelije sa visokim stepenom proliferacije. Ćelije koje se u velikoj meri aktivno dele kao što su ćelije krvne loze, kao i ćelije crevnog epitela i kože, a zatim i ćelije jetre, bubrega i pankreasa. Nediferentovane ćelije i ćelije sa nižem stepenom diferencijacije su manje osetljivije nego visokodiferentovane ćelije (Rai i sar., 2011).

Mikotoksini iz grupe trihotecena se vezuju za ribosome, remeteći time sintezu molekula DNK i proteina (Pestka, 2007). T-2 toksin izaziva inhibiciju sinteze eukariotskih proteina, inhibiciju ćelijske deobe i sinteze RNK/DNK, inhibiciju aktivacije signalnih puteva protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK), promenu integriteta membrane, poremećaj funkcije mitohondrija, indukciju ekspresije gena citokina i ćelijsku smrt (Rocha i sar., 2005; Wu i sar., 2013).

Citotoksični efekti T-2 toksina, mogu da se manifestuju apoptozom ćelija stvaranjem slobodnih radikala, i to prevashodno peroksidnih, hidroksilnih radikala kao i superoksidnih molekula, što dovodi do peroksidacije viših nezasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani i njenih oštećenja (Lobo i sar., 2010). U *in vitro* uslovima, T-2 toksin dovodi do apoptoze različitih ćelija u ćelijskim kulturama, što je potvrđeno i ispitivanjima kod miševa, gde dolazi do apoptoze ćelija kože, bubrega, moždanog tkiva i kostne srži (Afsah-Hejri i sar., 2013). Takođe, prema navodima (Dvorska i Surai, 2001) usled prisustva T-2 toksina u hrani za prepelice u koncentraciji od 8,1 mg/kg došlo je do smanjenje koncentracije antioksidanata u jetri i do povećanja koncentracije malon dialdehida tj. do peroksidacije lipida u jetri.

Sprovedena brojna istraživanja dokazuju inhibiciju sinteze proteina u *in vitro* ćelijskim kulturama sisara. Izloženost hepatocita pacova koncentraciji T-2 toksina od 0,01 ng/ml dovodi do inhibicije sinteze proteina za 75% (Trusal i O'Brien, 1986). Ispitivanja su pokazala da T-2 toksin u koncentraciji od 0,75 mg/kg TM kod miševa dovodi do inhibicije sinteze proteina u koštanoj srži, slezini i timusu (Feinberg i McLaughlin, 2017; Organization, 1990; Rosenstein i Lafarge-Frayssinet, 1983; Thompson i Wannemacher Jr, 1990).

Usled oksidativnog stresa proteina dolazi do oštećenja DNK, aktiviranja mitohondrijskih puteva apoptoze i posledično ćelijske smrti. Citohrom C iz mitohondrija i povećana aktivnost specifičnih proteaza dovodi do apoptoze u ćeliji. Na osnovu druge teorije, ćelijska smrt nastupa nakon indukcije MAPK i protein kinaze aktivirane stresom/C-jun N-terminalna kinaza (SAPK/JNK) koje nastaju posledično usled inhibicije proteina ili lipidne peroksidacije i oslobađanje slobodnih radikala. Apoptoza uzrokovana T-2 i HT-2 toksinom prvenstveno zahvata tipove ćelija koje brzo proliferišu

(hematopoetska, limfoidna i gastrointestinalna tkiva) (Jaradat, 2005; Schuhmacher-Wolz i sar., 2010).

S obzirom na razvoj oksidativnog stresa pod uticajem T-2 toksina, smatra se da dodatak antioksidanata u hranu za životinje može ostvariti zaštitni efekat (Rizzo i sar., 1994). Kao i ostali mikotoksini i trihoteceni svoje toksične efekte delimično ostvaruju direktnom interakcijom sa enzimima i koenzimima ćelija, čime modifikuju enzimsku aktivnost i metabolizam materija. T-2 toksin može da inaktivira enzime koji sadrže tiol grupu (-SH) (Suneja i sar., 1989). Kod T-2 toksina, tiol grupa omogućava potencijalnu inhibiciju transkripcije i translacije (Nyangi i sar., 2016). Na samom mestu transkripcije, T-2 se vezuje i inaktivira funkciju peptidil-transferaze (Henghold, 2004), čime se ograničava sinteza proteina (Krska i sar., 2014). T-2 toksin ima afinitet da se veže za ribozomalni sistem 60S, čime se blokira inicijacija polipeptidnog lanca (Devreese i sar., 2013). T-2 ispoljava efekte inhibicije na nivou transkripcije i translacije što utiče znatno na ćelije koje rastu: ćelije sluznice gastrointestinalnog trakta, koštano srž, hematopoetske matične ćelije, kože i eritroidne ćelije (Rai i sar., 2011). T-2 toksin menja fiziološku ulogu membrane čime sprečava proliferaciju limfocita, menja proizvodnju antitela i rast dendritskih ćelija (Obremski i sar., 2013). T-2 toksin deluje sa subćelijskim strukturama što dovodi do poremećaja morfologije mitohondrija, granuliranog endoplazmatskog retikuluma i ostalih slojeva membrane (Afsah-Hejri i sar., 2013).

T-2 toksin dovodi do redukcije sukcinata i citrata u urinu i smanjenja nivoa fumarata u jetri, uz povećanje nikotinamid-adenin-dinukleotida kod pacova, što sugeriše da T-2 toksin dovodi do inhibicije ciklusa limunske kiseline (Adhikari i sar., 2017).

#### **2.2.6. Teratogenost, karcinogenost i imunska toksičnost T-2 toksina**

Zbog postojanje ograničenih dokaza o karcinogenosti kod životinja, Međunarodna agencija za istraživanje raka, svrstala je T-2 toksin u kategoriju 3 (IARC, 1987).

U eksperimentu koji je sproveden na 100 miševa, koji su hranjeni sa 1,5 i 3,0 mg/kg hrane T-2 toksina, pojava plućnih adenoma i adenoma jetre mužjaka bila je signifikantno viša u odnosu na kontrolnu grupu (Schiefer i sar., 1987).

T-2 toksin ostvaruje imunosupresivne efekte prekidom deobe ćelija u kostnoj srži, slezini, timusu, limfnim čvorovima i crevnoj sluznici. Tretiranje T-2 toksinom kod pacova dovodi do limfoidne deplecije u timusu, slezini i BF (Rahman i sar., 2021). Takođe, dolazi do smanjenog stvaranja limfocita, poremećaja u sekreciji interleukina, smetnji u sintezi antitela i ometanja razvoja dendritičnih ćelija (Obremski i sar., 2013).

Prema podacima Naučnog odbora za hranu EU postoje ograničeni dokazi o tumorogenosti T-2 toksina kod eksperimentalnih životinja (indukcija hepatocelularnih i plućnih adenoma kod mužjaka miševa) (Chain, 2011)2.2.11 T-2 toksin u hranivima i hrani za životinje

Trovanje životinja T-2 toksinom u najvećoj meri nastaje unosom kontaminirane hrane. T-2 toksin se najčešće nalazi u zrnastim hranivima, kao što su kukuruz, ovas, pšenica, ječam, pirinač i soja (Krska i sar., 2014). Na osnovu dobijenih podataka srednja vrednost koncentracije T-2 toksina u nekim hranivima iznosila je 4,6 µg/kg za ječam, 3,2 µg/kg za kukuruz, 21 µg/kg za ovas, 0,7 µg/kg za pirinač, 0,2 µg/kg za raž i 1,6 µg/kg za pšenicu (Canady i sar., 2001). Od 24 uzorka zrna ječma, 50% je bilo pozitivno na prisustvo T-2 toksina, u koncentraciji od 0,02 do 2,4 mg/kg, pri čemu je u polovini od tih uzoraka bio prisutan i HT-2 toksin u koncentraciji od 0,01 do 0,37 mg/kg (Placinta i sar., 1999).

U studiji iz 2019. godine ispitivano je 40 uzoraka hrane za brojlere, komercijalnih proizvođača na prisustvo AfB<sub>1</sub>, ohratoksina A, T-2 toksina, fumonizina i zearalenona. T-2 toksin je detektovan u 21 ispitivanom uzorku Iračkih i u 19 uzoraka Iranskih proizvođača hrane u koncentraciji od (2,00-16,00) µg/kg i (2,00-23,00) µg/kg (Bibani i sar., 2019).

Istraživanje koje je sprovedeno na 3000 uzoraka hraniva u osam zemalja Evrope, potvrdilo je kontaminaciju T-2 toksinom kod 20% ispitivanih uzoraka, od toga je najčešća kontaminacija bila evidentirana u kukuruzu kod (28%), pšenice (21%) i ovsu (21% ispitivanih uzoraka). Takođe, utvrđeno je prisustvo HT-2 toksina u uzorcima ovsa (41%), kukuruza (24%) i raži (17%) (Gareis, 2003).

Istraživanja sprovedena u periodu od 2002. do 2005. godine, potvrdila su prisustvo T-2 toksina kod (84%) i HT-2 toksina kod (92%) ispitivanih uzoraka, u koncentracijama iznad 10 µg/kg. Zajednička srednja vrednost za T-2 i HT-2 toksin iznosila je 213 i 570 µg/kg (Edwards, 2009).

Istraživanje koje je sprovedeno u Italiji u periodu od 2011. do 2014. godine pokazuje da se kontaminacija ječma T-2 toksinom kretala od 22% do 53% ispitivanih uzoraka, dok su se vrednosti kontaminacije kretale u rasponu od 26 do 787 µg/kg (Morcia i sar., 2016).

U istraživanju koje je sprovedeno u Hrvatskoj od 1998. do 2004. godine, zabeležene su koncentracije T-2 toksina od 100-500 µg/kg ili kod 16,8% ispitivanih uzoraka hrane za životinje (Sokolović i Šimpraga, 2006).

U kukuruzu koji je uzgajan tokom kišovitoog perioda u Hrvatskoj, zabeleženo je prisustvo T-2 toksina u 24,4% ispitanih uzoraka tokom 2012. godine (Pleadin i sar., 2012).



Analizom žitarica detektovano je prisustvo 304,2 µg/kg i 521,0 µg/kg T-2/HT-2 toksina u uzorcima ovsu, dok je u hrani za telad zabeleženo 129,3 µg/kg T-2 toksina, (Pleadin i sar., 2017).

Istraživanja sprovedena od 2005-2014. godine u Finskoj, pokazala su da je srednja vrednost zbira koncentracija T-2 i HT-2 toksina iznosila za ovas 43-161 µg/kg, a za pšenicu, ječam i raž 25 µg/kg (Hietaniemi i sar., 2016).

U uzorcima neprerađenog ovsu koji su prikupljeni u Irskoj u periodu od 2015-2016. godine, utvrđena je učestalost prisustva T-2 toksina od 41% i HT-2 toksina od 51% u ukupno 208 ispitivanih uzoraka. Najniža zabeležena vrednost T-2 toksina iznosila je 55 µg/kg, dok je najviša vrednost iznosila 1102 µg/kg. Kod HT-2 toksina najniža vrednost je iznosila 53 µg/kg, dok je najviša vrednost iznosila 3405 µg/kg (De Colli i sar., 2021).

Ispitivanja koja su sprovedena u Evropi u periodu od 2013. do 2019. godine, pokazala su učestalost prisustva T-2 toksina od 98,1% i HT-2 toksina od 96,7% od ukupno 281 ispitivanih uzoraka. Srednja vrednost zbira koncentracija navedenih toksina iznosila je 149 µg/kg (Meyer i sar., 2021).

MDK T-2 toksina nisu propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje („Službeni glasnik RS", br. 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 i 54/2017), već su preuzete vrednosti iz regulative Evropske Unije (European Commission, 2013).

**Tabela 5. MDK T-2 toksina u hranivima i hrani za životinje regulativa**

	MDK (mg/kg)
Komponente za hranu za sve vrste životinje osim za mačke	0,25
Hrana za mačke	0,05

### **2.2.7. T-2 toksikoza živine**

Toksični efekti T-2 toksina se kod živine manifestuju u vidu apatije, inapetence, pojave lezija u ustima i crevima, proliva, negativnog uticaja na imunski i hematopoezni sistem, pada nosivosti i smanjenja debljine ljuske jaja, gubitka TM, nepravilnog položaja krila, lošeg kvaliteta perja, kao i neuroloških simptoma. Diferencijalno dijagnostički treba uzeti u obzir mnoga slična oboljenja, kao što su kandidijaza i atipična kuga živine (Nešić, 2007).

Ispitivanje izvršeno na guskama 2023. godine, pokazalo je da su parametri vezani za funkciju jetre alanin amino-transferaza (ALT) i aspartat amino-transferaza (AST) značajno povećani u

grupama kojima je T-2 toksin dodavan u koncentracijama od 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 i 2,0 mg/kg hrane u odnosu na kontrolnu grupu. Isto tako, grupe koju su dobijale T-2 toksin imale su značajno povišen nivo laktat dehidrogenaze (LDH) u odnosu na kontrolnu grupu (Gu i sar., 2023).

Pored toga, T-2 toksin dovodi i do produženja protrombinskog vremena (Doerr i sar., 1974; Doi i sar, 2008). Smanjen nivo hemoglobina, smanjenje vrednosti holesterola i ukupnih proteina u serumu, kao i povećanje koncentracije mokraćne kiseline se uočavaju pri koncentraciji od 2 mg/kg T-2 toksina kod ptica (Indresh i Umakantha, 2013).

Najmarkantniji efekat T-2 toksina kod brojlera obično je stomatitis sa razvijenim nekrotičnim promenama, praćenim prekomernim razmnožavanjem saprofitske mikroflore. Karakteristične lezije u usnoj duplji su ustanovljene kod svih brojlera koji su tri nedelje dobijali T-2 toksin, i to već pri koncentracijama od 1 mg/kg hrane. Početne promene se pojavljuju već 7 dana nakon unošenja T-2 toksina i manifestuju se u vidu izdignutih kazeoznih žuto-belih plakova. Nakon 14 dana lezije su se povećale i zahvatile koren jezika, dok su nakon tri nedelje lezije bile veoma izražene. Iz lezija su izolovane *E. coli* i *Staphylococcus epidermidis*.

U komercijalnom jatu brojlera, koji su hranjeni hranom kontaminiranom sa 2,5 mg/kg T-2 toksina, zapaženo je loše operjavanje, depresija, nekroza sluznice usta i atrofija limfoidnog tkiva (Akande i sar., 2006; Bitay i sar., 1981). Nervni simptomi su primećeni kod brojlera koji su dobijali T-2 toksin u dozi od 4 mg/kg hrane.

Hematološke promene nisu bile značajno izražene kod brojlera kojima je davan prečišćeni T-2 toksin (8 ili 16 mg/kg), već kod brojlera hranjenih sirovim ekstraktom T-2 toksina. Zapaženo je značajno smanjenje broja leukocita, trombocita, eritrocita i koncentracije hemoglobina (Adhikari i sar., 2017; Joffe i Yagen, 1978). Do značajnog negativnog uticaja na koagulaciju krvi, došlo je kod brojlera starih 40 dana koji su dobijali T-2 toksin u koncentraciji od 16 mg/kg hrane (2 mg/kg TM) (Doerr i sar., 1981). Imunosupresija sa smanjenom rezistencijom prema bakterijama je zabeležena kod brojlera kojima je davan T-2 toksin u dozama višim od 4 mg/kg hrane.

Eksperiment je sproveden na 300 jednodnevnih brojlera koji su hranom dobijali 0, 50, 100, 150 i 200 µgT-2 toksina/kg hrane. Kod brojlera je zapažen smanjen unos hrane, povećan koeficijent konverzije (KK) hrane kao i smanjenje TM kod grupa koje su hranom dobijale 150 i 200 µg/kg T-2 toksina. Ukupna koncentracija proteina u serumu bila je najniža u grupi koja je hranom dobijala 200 µg/kg T-2 toksina. Niži nivo holesterola i hemoglobina, povećan sadržaj mokraćne kiseline, AST i ALT zabeležen je u grupama koje su hranom dobijale 150 i 200 µg/kg T-2 toksina (Singh i sar., 2020).

Ispitivanje koje je sprovedeno na 160 jednodnevnih pilića tokom tri nedelje, pokazuje da koncentracije od 2 mg/kg T-2 toksina imala negativan efekat na TM, prirast i konverziju hrane. Kod brojlera su zabeležene lezije u ustima što je prouzrokovalo odbijanje hrane (Nešić i sar., 2011).

Takođe, odbijanje hrane kao simptom koji se javlja usled trovanja T-2 toksinom posledica je promena u usnoj duplji i sluzokoži tankog creva, uz smanjenje TM i konzumacije hrane (Ueno, 1977).

### **2.2.8. Uticaj T-2 toksina na proizvodne rezultate živine**

Kao i svi ostali mikotoksini i T-2 toksin ima negativne efekte na proizvodne rezultate živine a koji se manifestuju smanjenjem TM, prirasta i konzumacije hrane a povećanjem KK.

Smanjenje unosa hrane i gubitak TM su zapaženi pri koncentracijama T-2 toksina od 2 do 6 mg/kg hrane, dok opisani efekti nisu bili prisutni pri koncentraciji od 1 mg/kg hrane (Raju i Devegowda, 2000).

Davanje T-2 toksina u dozi od 2 mg/kg hrane u prvih 28 dana je dovelo do značajnog smanjenja TM i prirasta kod brojlera (Diaz i sar., 2005). Do istih efekata je doveo i T-2 toksin koji je u koncentraciji od 1 mg/kg dodat u hranu brojlera tokom prvih pet nedelja života, kada je ovo smanjenje TM u odnosu na kontrolnu grupu iznosilo oko 20% (Fazekas i sar., 2000).

U studiji o uticaju T-2 toksina, opisan je efekat različitih koncentracija toksina u hrani na proizvodne rezultate. Brojleri su hranom dobijali T-2 toksin u koncentracijama: 0, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg i 0,2 mg/kg hrane. Studija je pokazala da se konzumacija hrane i prirast nisu značajno razlikovali kod grupa koje su hranom dobijale 0,05 i 0,1 mg T-2 toksina/kg hrane u odnosu na kontrolnu grupu. Dok su grupe koje su hranom dobijale 0,15 mg/kg i 0,2 mg/kg T-2 toksina imale značajno nižu konzumaciju i prirast (Singh i sar., 2020). Slične nalaze prezentovali su i (Raju i Devegowda, 2000) koji navode da prisustvo T-2 toksina u hrani za brojlere u koncentraciji od 3 mg/kg hrane utiče veoma negativno na prirast i konzumaciju hrane.

Brojleri tretirani sa 0,4 mg T-2 toksina/kg hrane imali su slabiji prirast u odnosu na životinje kontrolnu grupu. Pri dodavanju viših koncentracija T-2 toksina, od 4 mg/kg do 16 mg/kg hrane tretirani pilići su ispoljili slabiji prirast uz izražene oralne lezije i povećan mortalitet (Singh i sar.).

(Wei i sar., 2019) su grupi brojlera u hrani dodavali 6 mg/kg T-2 toksina, i ustanovili da su smanjenu konzumaciju hrane i prirasta koje je iznosilo 11,4% do 31,8% u odnosu na grupu brojlera koja je dobijala hranu bez T-2 toksina.

(Indresh i Umakantha, 2013) su brojlerima hranom davali 2 mg/kg T-2 toksina, što je dovelo do smanjenja prirasta i TM kod ove grupe brojlera u odnosu na kontrolnu grupu.

U ispitivanju koje je trajalo 28 dana, T-2 toksin je dodat u koncentraciji od 2 mg/kg u hranu brojlera, što je dovelo do značajnog smanjenja TM, koje je na kraju ispitivanja iznosilo 9% u odnosu kod brojlera koji su hranom dobijali T-2 toksin u koncentraciji od 1 i 2 mg opisano je smanjenje TM za 22% i 46% u odnosu na brojlere K grupe. (Pande i sar., 2006). Ispitivanje koje je sprovedeno tokom 35 dana na brojlerima, pokazalo je da dodavanje hranom 1 mg/kg T-2 toksina nije uticalo na TM i KK hrane (Sklan i sar., 2001).

### **2.2.9. Uticaj T-2 toksina na HP promene u jetri, srcu, crevima i BF**

T-2 toksin dovodi do patomorfoloških promena u jetri, organima digestivnog trakta, kostnoj srži, koži, srcu, plućima, reproduktivnim organima, slezini, BF i nervnom tkivu. HP promene obično obuhvataju degenerativne promene u jetri, bubrezima i retko u srcu, kao i površne nekroze digestivnog trakta. U hroničnim slučajevima, izraženije su promene na bubrezima u vidu intersticijalnog nefritisa, skleroze bubrega i glomerulonefritisa, dok nekrotične promene u digestivnom traktu postaju značajnije izražene (Stoev i sar., 2010).

Radi ispitivanja makroskopskih i HP promena, brojlerima je dato 2 mg/ T-2 toksina /kg TM jednokratno, sondom u voljku. Kod brojlera žrtvovanih posle 24 časa, promene su se manifestovale difuznom hiperemijom skeletnih mišića, prisustvom tečnog sadržaja u tankim crevima, diseminovanih tačkica po jetri, punom žučnom kesom. Kod manjeg broja jedinki, konstatovana je hiperemija sluznice tankih creva i zida žučne kese, edema bubrega i crvenkastog prebojavanja kostne srži tibije. Patohistološke promene su posle 24 časa bile prisutne u timusu, BF, cecalnim tonzilama, slezini, kostnoj srži, jetri i žučnoj kesi, želucu, crevima i perju. Kod jedinki žrtvovanih nakon 7 dana, nije bilo značajnih promena u vidu atrofije limfnog tkiva, koja je prisutna nakon 24h. U jetri su zapažena nekrotična žarišta po čitavom parenhimu jetre, uz blagu hiperplaziju žučnih puteva. U ekstrahepatičnim žučnim putevima i žučnoj kesi zapažaju se hiperemija i prisustvo malih bazofilnih citoplazmatskih granula u lamini propriji epitela. Promene na gastrointestinalnom traktu su u vidu blage atrofije crevnih resica i nekroze epitela crevnih resica, i to vrha u duodenumu, i kripti u tankom i debelom crevu, sa malim bazofilnim citoplazmatskim granulama u epitelnim ćelijama (Hoerr i sar., 1981).

Kod sedmodnevnih brojlera koji su dobijali T-2 toksin u koncentraciji od 1,5 do 3 mg/kg hrane tokom dve nedelje, zapažena je atrofija limfnih organa, dok su mikroskopski ustanovljeni nekroza i deplecija limfoidnog i hematopoeznog tkiva, nekroza hepatocita, ćelija žučnih kanala i sluznice creva (Hoerr i sar., 1982).

Kod brojlera koji su tokom druge i treće nedelje života dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina u hrani, ustanovljene su promene u vidu masne degeneracije i nekroze u jetri, kataralni duodenitis sa atrofijom crevnih resica, kao i voštana fokalna degeneracija miokarda (Grabarević i sar., 1992).

Brojleri koji su dobijali T-2 toksin u dozi od 1 mg/kg hrane tokom 40 dana kod 90% brojlera primećene su promene u vidu nekroze sluznice usta, dok je generalno kod brojlera bila prisutna atrofija limfnih organa, edem sluzokoža i akumulacija tamnožute tečnosti u abdominalnoj duplji (Fazekas i sar., 2000).

Grupa brojlera koja je hranom dobijala 2 mg/kg T-2 toksina ispoljava promene u jetri u vidu multifokalnih nekrotičnih žarišta, prugastih subkapsularnih krvavljenja, umereno proširenih sinusoidnih kapilara, degeneracije hepatocita i hepatocelularne nekroze jetre. U crevima se zapaža degeneracija i deskvamacija enterocita, kao i kataralni enteritis. Takođe, zapažene su promene u vidu atrofije limfnog tkiva u kori i srži BF (Nešić, 2007).

Brama kokoške nosilje koje su spontano otrovane hranom koja je sadržala 0,7 mg/kg T-2 toksina, imale su promene u jetri u vidu vakuolarne distrofije i pasivne hiperemije. Promene u crevima zabeležene su kao teški nektotični tifilitis sa difteroidnim pseudomembranama. U BF bila je izražena deplecija i nekroza limfocita (Konjević i sar., 2004).

#### **2.2.10. Rezidue T-2 toksina**

S aspekta prisustva rezidua u namirnicama životinjskog porekla, trihoteceni, a naročito T-2 toksin, spadaju u manje značajne mikotoksine. Nakon unosa trihotecena ne dolazi do njihove bioakumulacije u telu životinje, odnosno, dolazi do njihove potpune eliminacije u roku od nekoliko dana.

Rezidue T-2 toksina su detektovane u jetri, bubrezima i mišićima 12h nakon aplikacije, dok su nakon 24h bile ispod limita kvantifikacije (LOQ) (Giroir i sar., 1991). Kako je toksičnost T-2 toksina veća u *in vitro* nego u *in vivo* uslovima (Bauer, 1995), a pritom se i rapidno metaboliše, Nema puno navoda u literature o nalazu rezidua T-2 toksina i njegovih metabolite u uzorcima tkiva živine.

U studiji koja je sprovedena na brojlerima koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina, nisu zabeleženi rezidualni ostaci T-2 toksina i njegovih metabolita u jetri i mišićima brojlera. Iz ovoga, može se potvrditi da se T-2 toksin brzo metaboliše i eliminiše bez akumulacije u jestivim tkivima (Stefanović i sar., 2023).

### **2.3. SREDSTVA ZA SMANJENJE KONTAMINACIJE HRANE ZA ŽIVOTINJE MIKOTOKSINIMA**

Više različitih postupaka može se sprovesti u cilju smanjivanja toksičnosti mikotoksina. Ovi postupci podrazumevaju onemogućavanje produkcije mikotoksina od strane poljskih i “skladišnih plesni”, redukciju resorpcije toksina iz gastrointestinalnog trakta životinja i korišćenje režima ishrane koji neutrališu metaboličke efekte AfB<sub>1</sub>.

Evropska Komisija regulativom od 12. maja 2009. godine (EC 386/2009) definiše novu funkcionalnu grupu aditiva za hranu za životinje. To su supstance koje mogu smanjiti kontaminaciju hraniva i hrane za životinje mikotoksinima. U zavisnosti od načina delovanja ti aditivi mogu smanjiti bioraspoloživost mikotoksina ili ih degradirati i pretvoriti u manje toksične metabolite.

Dele se na dve osnovne kategorije: a) adsorbentna ili vezivna sredstva i b) sredstva koja degradiraju mikotoksine i/ili biotransformišu mikotoksine (bakterije, plesni, kvasci i enzimi).

U praksi najviše primenjivan način ublažavanja i eliminisanja štetnih efekata mikotoksina je korišćenje adsorbenata. Adsorbenti su materijali koje se ne resorbuju iz creva, a imaju sposobnost vezivanja određenih hemijskih supstanci čime sprečavaju njihovu resorpciju. Najčešće se primenjuju neorganski adsorbenti (hidratisani natrijum kalcijum aluminosilikat-HSCAS, natrijum bentonit, glinena zemlja i različiti tekto aluminosilikati, slojeviti ili filo silikati-zeoliti).

Zeoliti su kristalni, hidratisani tekto aluminosilikati alkalnih i zemnoalkalnih katjona, koji imaju beskonačnu trodimenzionalnu kristalnu strukturu. Poseduju sposobnost da bez većih promena strukture gube i primaju vodu i da izmenjuju neke od svojih konstitucionih katjona (Tomasevic-Canovic i sar., 1997). Zbog ovih osobina zeoliti se primenjuju i kao molekulska sita i katjonski izmenjivači katalizatori u mnogim reakcijama (Godovikov, 1983).

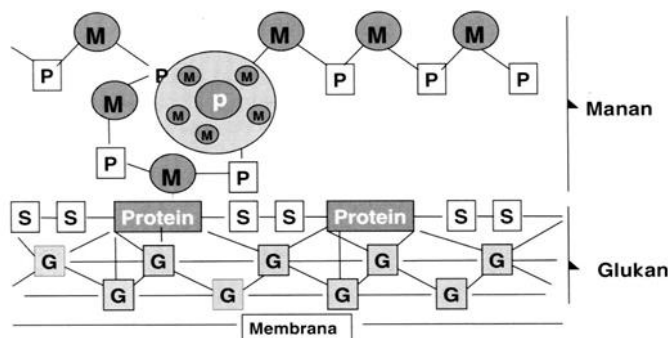
Karakteristika svih zeolita je prisustvo kanala, otvora i šupljina (Meier i sar., 1987). U mreži se javljaju tri vrste kanala. Jedna vrsta kanala je formirana od desetočlanih (0,44 x 0,72 μm), a druge dve od osmočlanih (0,40 x 0,55 μm) kiseoničkih prstenova. Veći kanal i jedan od manjih su paralelni sa x i y kristalografskim osama, dok je drugi osmočlani prsten normalan na njihovu ravan. Kristalni zeoliti su pogodni adsorbenti i karakterišu se slobodnom zapreminom 20-50% i velikom specifičnom površinom. U prirodi se nalazi više vrsta prirodnih zeolitskih minerala različitog hemijskog sastava, a samim tim i kvaliteta (Meier i sar., 1987). Najširu primenu među njima ima mineral klinoptilolit. Primena prirodnih zeolita zavisi od njihovih fizičko-hemijskih osobina, kao što su: izmena katjona i adsorpcija, osobine „molekulskog sita“, hidratacija/dehidratacija (specijalni oblik adsorpcije) i osobine mineralnog agregata ili karakteristike rudne mase (veličina i oblik zrna, poroznost i tvrdoća).

S obzirom da su izmenljivi katjoni kod klinoptilolita smešteni u zeolitskim kanalima, reakcijama jonske izmene dobijaju se minerali novih osobina, pri čemu se sama struktura klinoptilolita ne narušava (Tomašević-Čanović i sar., 1997). Tehnološkom preradom prirodnog zeolita sa više od 80% klinoptilolita, izbalansiranog odnosa izmenljivih katjona Ca/K/Na, dobijen je mineralni adsorbent Minazel koji efikasno adsorbuje polarne (Afb<sub>1</sub> i ergot alkaloidi), a manje, slabije polarne molekule mikotoksina (ZEA, OTA i T-2).

Sledeću grupu adsorbentnih sredstava predstavljaju nerastvorljivi ugljeni hidrati poreklom iz ćelijskog zida kvasca. U toku razvoja biotehnologije i primene raznih vrsta dodataka ukazuje se sve veća potreba za korišćenjem prirodnih bioloških produkata za redukciju uticaja mikotoksina u animalnoj proizvodnji. U novije vreme istražuju se mogućnosti ublažavanja ili eliminisanja štetnih efekata mikotoksina korišćenjem organskih adsorbenata, odnosno modifikovanih manan oligosaharida (Devegowda i sar., 1998). Složeni ugljeni hidrati, pretežno glukani, izolovani iz unutrašnjeg sloja ćelijskog zida kvasaca, poseduju izrazitu sposobnost adsorpcije mikotoksina, koja se zasniva na postojanju bipolarnog naelektrisanja (Devegowda i Aravind, 2002).

Adsorptivni potencijal ove vrste materijala prvi put je uočen u ogledima na živini kada je u hranu kontaminiranu Afb<sub>1</sub> dodata kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čime su delimično bili izbegnuti štetni efekti mikotoksina.

Ćelijski zid kvasca sastoji se gotovo isključivo iz proteina i ugljenih hidrata. Ugljenohidratna frakcija sačinjena je primarno od glukoze, manoze i N-acetilglukozamina. Glukani i manani, dva glavna šećera, prisutna su u skoro jednakim količinama kod *Saccharomyces cerevisiae* (Slika 10). *S. cerevisiae* sadrži glukane uglavnom sa β-1-3 vezama i manje β-1-6 veza. Manan lanci različitih veličina eksponirani su na spoljašnjoj površini i povezani su sa proteinima ćelijskog zida.



**Slika 10. Struktura ćelijskog zida *Saccharomyces cerevisiae*** (Evans i Dawson, 2000)

Sredstva koja mogu da degradiraju mikotoksine do manje toksičnijih jedinjenja su bakterije, kvasci, plesni i enzimi: gram pozitivne anaerobne bakterije: BBSH 997, izolovana iz tečnosti rumena; nesporulirajuće bakterije iz roda Eubakterija; gram pozitivne aerobne bakterije: *Nocardia Asteroides*,

*Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* i *Streptomyces*; gram negativne aerobne bakterije: *Flavobacterium aurantiacum* (NRRL B-184), *Pseudomonas*, *Alcaligenes* i *Bacillus* mogu da se koriste u kombinaciji; plesni i kvasci: *Aspergillus*, *Eurotium herbariorum*, *Rhizopus spp.* *Penicillium raistricki*, *Rhinocladiella atrovirens*.

### **2.3.1. Efikasnost preparata za detoksifikaciju AfB<sub>1</sub> kod živine**

Sprovedena su istraživanja uticaja zeolita koji je dodavan u količini od 10 kg/t hrane koja je sadržala 2,5 mg/kg AfB<sub>1</sub> kod brojlera starosti 21. do 42. dana. Posle 42. dana eksperimenta zapaženo je da je kod grupe koja je hranom dobijala toksin i adsorbent, TM bila viša za 10% u odnosu na kontrolnu grupu (Miazzi i sar., 2000).

(Pasha i sar., 2007) su u svom eksperimentu dokazali da je grupa brojlera koja je hranom dobijala 100 µg/kg AfB<sub>1</sub> sa dodatkom 0,5% natrijum bentonita značajno poboljšala TM, konzumaciju i konverziju hrane u odnosu na grupu brojlera koja je hranom dobijala samo AfB<sub>1</sub>. TM brojlera koji su hranom dobijali 100 µg AfB<sub>1</sub> sa dodatkom 0,5% natrijum bentonita bila je viša za 25% u odnosu na grupu brojlera koja je hranom dobijala samo AfB<sub>1</sub>. Konzumacija hrane kod brojlera koji su hranom dobijali 100 µg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,5% natrijum bentonita bila je 15% viša od grupe brojlera koja je hranom dobijala 100 µg AfB<sub>1</sub>. Relativna težina jetre kod brojlera koja su hranom dobijali 100 µg AfB<sub>1</sub> sa dodatkom 0,5% natrijum bentonita iznosila je 3,6% dok je kod grupe koja je hranom dobijala samo 100 µg AfB<sub>1</sub> iznosila 5,34%. Ovom studijom je dokazano da je bolje rezultate pokazalo dodavanje hranu za životinje 0,5% u odnosu na 1% natrijum bentonita.

(Mishra i Swain, 2022) su u cilju neutralisanja AfB<sub>1</sub> koristili aktivni ugalj u ishrani brojlera da bi smanjili njegovu resorpciju iz gastrointestinalnog trakta, budući da se AfB<sub>1</sub> vezuju za njega pre nego što se eliminiše iz gastrointestinalnog trakta. Istraživanje, grupa brojlera koje je hranom dobijala 0,5 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 200 mg aktivnog uglja, pokazuje da aktivni ugalj ima umereno efikasan uticaj na smanjenje štetnih efekata AfB<sub>1</sub>. U eksperimentu koji je izveden na brojlerima starim 3 nedelje, zapaženo je da je grupa brojlera koja je hranom dobijala AfB<sub>1</sub> imala za 8% nižu TM u odnosu na grupu brojlera koja je hranom dobijala AfB<sub>1</sub> i aktivni ugalj. Relativna telesna težina jetre kod grupe brojlera koja je uz AfB<sub>1</sub> dobijala i aktivni ugalj bila je signifikantno niža u odnosu na grupu brojlera koja je hranom dobijala AfB<sub>1</sub>.

(Denli i Okan, 2006) su procenjivali sposobnost HSCAS dijatomejske zemlje i aktivnog uglja u smanjenju štetnih efekata AfB<sub>1</sub> u hrani brojlera. Istraživanje je sprovedeno na 308 brojlera tokom



42 dana, navedeni adsorbenti dodavani su u hranu u količini od 2,5 kg/t hrane koja je takođe sadržala i 0, 40 i 80 µg/kg AfB<sub>1</sub>. Kontrolna grupa brojlera imala je signifikantno višu TM u odnosu na ostale grupe brojlera, osim grupe životinja koja je hranom dobijala 40 µg/kg AfB<sub>1</sub> i 2,5 kg/t HSCAS. Aktivni ugalj i diatomit koji su dodavani u hrani nisu ublažili štetne efekte AfB<sub>1</sub>. Grupa brojlera koja je hranom dobijala 80 µg/kg AfB<sub>1</sub> imala je signifikantno višu relativnu težinu jetre u odnosu na grupe brojlera koji su uz AfB<sub>1</sub> dobijali i određeni adsorbent. Takođe, grupa brojlera koje je uz AfB<sub>1</sub> dobijala i HSCAS skoro da nema uočljivih lezija na jetri, dok je struktura jetre ostala nepromenjena. Sposobnost čvrstog vezivanja HSCAS-a za AfB<sub>1</sub> u gastrointestinalnom traktu povećava njegov protektivni efekat, čime se smanjuje bioraspoloživost hranom unetog AfB<sub>1</sub>. Grupe brojlera koji su hranom dobijali 40 i 80 µg/kg AfB<sub>1</sub> imali su nižu TM u odnosu na kontrolnu grupu i grupu brojlera koja je uz AfB<sub>1</sub> dobijala i HSCAS. Konverzija hrane kod kontrolne grupe bila je niža u odnosu na druge grupe brojlera. Može se zaključiti da je HSCAS pokazao viši protektivni efekat od ostala dva ispitivana adsorbenta.

U kliničkoj studiji sprovedena su istraživanja uticaja smektit gline na prisutni AfB<sub>1</sub> u hrani kod brojlera starosti 3-6 nedelja. Brojleri koji su hranom dobijali 0, 60 i 120 µg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak smektit gline imali su signifikantno višu TM u odnosu na grupe brojlera koji su hranom dobijali samo AfB<sub>1</sub>. Brojleri koji su hranjeni sa 60 i 120 µg/kg AfB<sub>1</sub> imali su signifikantno višu konverziju hrane u odnosu na kontrolnu grupu brojlera (Xie i sar., 2022).

U istraživanju koje je sprovedeno na 300 brojlera, ispitivana je sposobnost adsorbenata, glukomanana i Na-bentonita da umanje toksične efekte. Grupa brojlera koja je hranom dobijala 250 µg/kg AfB<sub>1</sub> imala je izražene patohistološke promene kao što su blaga do umerena hidropsna degeneracija i/ili masne promene na jetri, hiperplazija žučnih kanala, periportalna fibroza jetre, infiltracija i kongestija ćelija jetre. Dodavani adsorbenti u hranu brojlera nisu u potpunosti neutralisali štetne efekte AfB<sub>1</sub>, dok je dodavanje 0,1% glukomanana umanjilo stepen patohistoloških promena u jetri brojlera (Azizpour i Moghadam, 2015).

Tokom istraživanja koje je sprovedeno na 480 brojlera, ispitivan je efekat bakterija mlečne kiseline i HSCAS na mogućnost ublažavanja štetnih efekata AfB<sub>1</sub>. Brojleri su raspoređeni u četiri grupe: grupa koja je hranom dobijala 40 µg AfB<sub>1</sub>/kg, grupa koja je hranom dobijala 40 µg AfB<sub>1</sub>/kg i  $1,5 \times 10^{10}$  CFU bakterija mlečne kiseline, i grupa koja je hranom dobijala 40 µg AfB<sub>1</sub>/kg i 3g/kg HSCAS-a. Dobijeni rezultati pokazuju da je dodavanje bakterija mlečne kiseline i HSCAS poboljšalo proizvodne rezultate brojlera, dok je grupa koja je hranom dobijala 40 µg AfB<sub>1</sub>/kg imala smanjen prosečni dnevni prirast i povećanje KK hrane. Takođe, dodavanje bakterija mlečne kiseline i HSCAS povećali su svarljivost suve materije, sirovih proteina, sirove masti i svarljive energije (SE) za 4-15%. Rezultati pokazuju da su brojleri koji su hranom dobijali bakterije mlečne kiseline i HSCAS imali

veći kapacitet za detoksikaciju AfB<sub>1</sub>, dok su grupe brojlera kojima su u hrani dodavane bakterije mlečne kiseline imale bolji efekat u delimičnoj biotransformaciji AfB<sub>1</sub> u odnosu na grupu brojlera koja je hranom dobijala HSCAS (Liu i sar., 2018).

Ogledom koji je sproveden na 105 kokošaka nosilja, ispitivana je efikasnost multikomponentnog preparata za detoksikaciju mikotoksina koji je dodavan u količini od 2g/kg. Rezultati pokazuju da su grupe nosilja koje su hranom dobijale 0,05 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 1,5-2 mg/kg T-2 toksina nosile jaja sa smanjenom masom i težinom ljuske. Takođe, histopatološke promene koje su zabeležene u bubrezima i jetri bile su izraženije u grupama nosilja koje su hranom dobijala AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin bez dodatka multikomponentnog preparata (Raj i sar., 2023).

### **2.3.2. Efikasnost preparata za detoksifikaciju T-2 toksina kod živine**

Brojleri kojima je u hranu bio dodat T-2 toksin u količini od 1,25 mg/kg tokom 38 dana, postigli su značajno niže TM, dok je KK hrane bio značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, konstatovane su vidljive lezije u usnoj duplji. Dodatak HSCAS u kontaminiranu hranu u količini od 0,1% doprineo je značajnom porastu TM (1772:1563) i boljoj konverziji hrane (1,97:2,19), kao i smanjenju vidljivih lezija u usnoj duplji i mikroskopskih promena na jeziku, žlezdanom želucu, timusu i BF. Iz navedenog, može se zaključiti da je ispitivani adsorbent pokazao efikasnost u prevenciji toksičnih efekata T-2 toksina kod brojlera (Casarin i sar., 2006).

Kod brojlera koji su hranjeni kontaminiranom hranom koja je sadržala 1 mg/kg hrane T-2 toksina i 2,5 kg/t hrane HSCAS, šteni efekti T-2 toksina su skoro u potpunosti bili prevenirani dodatkom HSCAS. TM je bila niža za 23%, dok je konzumacija hrane bila niža za 21% u grupi koja je hranom dobijala 1 mg/kg T-2 toksina u odnosu na kontrolnu grupu brojlera. Dobijeni rezultati su bili skoro identični u kontrolnoj grupi brojlera i grupi koja je dobijala dodatak 2,5 g/kg hrane HSCAS. Lezije u usnoj duplji su kod većine jedinki bile umereno razvijene i nisu uticale na rast i razvoj brojlera. Na unutrašnjim organima nisu zapažene histopatološke promene. Na osnovu dobijenih rezultata može se utvrditi da dodavanje 2,5 g/kg hrane HSCAS može ublažiti štetne efekte T-2 toksina (Fazekas i sar., 2000).

Tokom 28 dana eksperimenta, grupe brojlera koje su hranom dobijale 2 mg/kg T-2 toksina imale su značajno niže TM u odnosu na brojlere kontrolne grupe. Unos hrane se nije značajno razlikovao ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Konverzija hrane bila je značajno bolja kod grupe brojlera koji su hranom dobijali 2 mg/kg T-2 toksina uz dodavanje 2,5 g/kg HSCAS. Nisu primećene značajne razlike u relativnoj težini jetre, srca i BF kod eksperimentalnih grupa brojlera (Diaz i sar., 2005).

U eksperimentu koji je trajao 35 dana, brojleri su hranom dobijali 1 mg/kg T-2 toksina i takođe, 1 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 10 g/kg HSCAS. Grupa brojlera koja je hranom dobijala samo T-2 toksina, imala je smanjeni prirast i povećanu KK. Dodavanje HSCAS-a, nije značajno uticalo na povećanje TM i konverziju hrane kod grupe brojlera koja je uz toksin dobijali i adsorbent. (Girish i Devegowda, 2006).

U ogledu koji je sproveden na 160 brojlera tokom 42 dana, brojleri koji su hranom dobijali 2 mg/kg T-2 toksina imala je nižu TM za 40 grama u odnosu na grupu brojlera koja je pored T-2 toksina dobijala 0,2% neorganskog adsorbenta (Minazel plus), a za 90 grama nižu TM u odnosu na kontrolnu grupu brojlera. Brojleri koji su hranom dobijale T-2 toksin ili T-2 toksin i neogransi adsorbent, imali su statistički značajno niže priraste u odnosu na kontrolnu grupu brojlera. Brojleri koji su hranom dobijala 2 mg/kg T-2 toksina, imali su značajno nižu konzumaciju hrane u odnosu na brojlere koji su uz T-2 toksin dobijali neorganski adsorbent, kao i na brojlere kontrolne grupe. (Nešić, 2007).

### 2.3.3. Efikasnost preparata za detoksifikaciju AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina u kombinaciji kod živine

U istraživanju koje je sprovedeno na brojlerima, ispitivan je pojedinačni i kombinovani efekat AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina na proizvodne rezultate, težinu organa i imunski status. Takođe, ispitivana je efikasnost dijetetskog proizvoda kvasca koji sadrži glukomanane i HSCAS u prevenciji štetnih efekata AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina. Tokom ispitivanja, brojleri su podeljeni na grupu koja je hranom dobijala 2 mg/kg AfB<sub>1</sub>, grupu koja je dobijala 1 mg/kg T-2 toksina, grupu koja je dobijala zajedno 2 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 1 mg/kg T-2 toksina, zatim grupu koja je dobijala 1 g/kg hrane dijetetskog proizvoda kvasca sa glukomananom i grupa koja je dobijala 10 g/kg HSCAS i kontrolnu grupu. Kod grupa brojlera koje su pojedinačno dobijale AfB<sub>1</sub> i T-2 zabeleženo je smanjenje prirasta i povećanje KK. Grupa brojlera koja je hranom dobijala AfB<sub>1</sub> imala je povećanu masu jetre, bubrega, želuca i slezine, dok je težina timusa i BF bila smanjena. Zabeležen je sinergistički negativan efekat AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina na TM, konverziju hrane, težinu organa i titar antitela. Dodavanje kvasca koji je sadržao glukomanan-oligosaharide, dovela je do povećanja TM i KK. Relativna težina jetre, bubrega i želuca bila je povećana u grupama koje su hranom dobijale AfB<sub>1</sub> i AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin zajedno. Možemo zaključiti da je kvasac ispoljio protektivne efekte u prisustvu oba mikotoksina a HSCAS samo u prisustvu AfB<sub>1</sub> (Girish i Devegowda, 2006).

U eksperimentu koji je sproveden na 96 jednodnevnih brojlera, ispitivan je efekat zajedničkog delovanja 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina, kao i pojedinačnog delovanja ovih toksina na proizvodne rezultate. Grupe brojlera koje su hranom dobijale zajedno AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin imale su na kraju ispitivanja značajno niže TM u odnosu na grupe brojlera koje su hranom pored toksina dobijale MR ili kontrolnu grupu brojlera koja je dobijala samo hranu bez toksina. Unos hrane bio je niži za 20,25% kod grupe brojlera koje su hranom dobijale zajedno AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin, što ukazuje na značajnu interakciju ova dva toksina. Konverzija hrane je bila značajno viša kod grupe brojlera koja je hranom dobijala zajedno AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin (2,2) u odnosu na kontrolnu grupu brojlera ili grupe brojlera koje su uz toksin dobijale 0,2% MR. Patohistološke promene u crevima, jetri, srcu i BF bile su izraženije kod grupe brojlera koje su hranom dobijale zajedno AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno grupe brojlera koje su hranom pored AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina dobijali 0,2% (MR) (Stefanović i sar., 2023).

### **3. CILJ I ZADATAK RADA**

Cilj ove doktorske disertacije bio da se ispita uticaj izabranih doza AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina, pojedinačno i u kombinaciji na zdravstveno stanje, proizvodne rezultate, patomorfološke promene u target organima i prisustvo rezidua AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina kao i njihovih metabolita u jetri i grudnoj muskulaturi brojlera.

Cilj ove teze takođe, je bio da se ispita i proceni efikasnost preparata za detoksikaciju mikotoksina MR dodatog u hranu brojlera i mogućnost ublažavanja štetnih efekata AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina pojedinačno i u kombinaciji, na zdravstveno stanje, proizvodne rezultate, makroskopske i histopatološke promene u target organima kao i prisustvo rezidua AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina kao i njihovih metabolita u jetri i grudnoj muskulaturi brojlera. Za ostvarivanje ovih ciljeva postavljeni su sledeći zadaci:

1. Praćenje zdravstvenog stanja i dinamike uginuća,
2. Praćenje ostvarenih proizvodnih rezultata:
  - a. TM u sedmodnevnim intervalima
  - b. prirast u sedmodnevnim intervalima
  - c. konzumacija hrane (po fazama ogleđa i ukupna)
  - d. koeficijent konverzije hrane (KK)
3. Praćenje makroskopskih i histopatoloških promena u:
  - a. crevima
  - b. jetri
  - c. srcu
  - d. Bursi fabricii
4. Praćenje prisustva rezidua AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina i njihovih metabolita u
  - a. jetri
  - b. grudnoj muskulaturi

Dobijeni podaci i rezultati će biti obrađeni, statistički analizirani sa ciljem da bi se izveli validni zaključci. Rezultati će biti prikazani u vidu tabela, grafikona i slika.

### **4. MATERIJAL I METODE RADA**

Prilikom postavljanja plana oglada i izbora metoda uzeti su u obzir cilj i zadatak rada, kao i iz literature poznati podaci o toksičnosti AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina i efikasnosti različitih preparata za detoksikaciju mikotoksina i ublažavanje njihovih štetnih efekata.

#### ***4.1 In vivo ogled***

Ispitivanje je organizovano na brojlerima po grupno kontrolnom sistemu.

##### **4.1.1 Izbor materijala**

Ogled je izveden u eksperimentalnom delu katedre za Bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu, na ukupno 96 jednodnevnih brojlera, oba pola, Cobb 500 provenijence prosečne telesne mase na početku oglada  $51,71 \pm 0,4$  g. Ogled je trajao 42 dana.

##### **4.1.2 Držanje i hranjenje eksperimentalnih životinja**

U toku trajanja oglada brojleri su držani u podnom sistemu, kao prostirka je korišćena piljevina drveta. Prostorija u kojoj je sproveden ogled pripremljena je pre početka oglada. Najpre je sprovedeno sanitarno pranje, zatim je izvršena dezinfekcija podnih površina biodegradabilnim dezinficijensom širokog spektra antimikrobnog dejstva. U objektu gde je obavljen ogled, zoohigijenski i mikroklimatski uslovi su u potpunosti odgovarali tehnološkim normativima za datu provenijencu.

Ogledne jedinke su hranjene potpunim smešama za ishranu brojlera u tovu (proizvodnja Patent komerc), sirovinskog i hemijskog sastava koji se menjao u zavisnosti od doba života oglednih životinja. Brojleri su hranjeni potpunim smešama standardnog sirovinskog sastava (Tabela 6.), koje su zadovoljavale u potpunosti potrebe oglednih jedinki različitih starosnih kategorija. Smeša za početni tov 1-21. dana, smeša za porast od 22-35. dana i smeša za završni tov od 36-42. dana. Brojleri su napajani iz ručnih pojilica, voda je menjana svakodnevno. Ishrana i napajanje brojlera tokom oglada bila je po volji (*ad libitum*).

**Tabela 6. Sirovinski sastav smeša za ishranu brojlera**

<b>R.br.</b>	<b>Komponente</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
1	Kukuruz	35,29	38,60	41,48

2	Pšenica	25,00	30,00	30,00
3	Soja, sačma (46%) MM	26,42	/	/
4	Sojina pogača 44 HM	7,00	22,06	19,42
5	Kukuruzna džibra suva	/	3,00	3,00
6	Ulje	2,10	1,75	2,05
7	Stočna kreda	1,50	1,60	1,70
8	Monokalcijum fosfat	0,81	0,89	0,68
9	AMK Metionin-DL (99%)	0,37	0,34	0,25
10	AMK Lizin-L (78%)	0,35	0,55	0,35
11	So (NaCl), jod	0,30	0,29	0,21
12	PF025 TP 301	0,25	0,23	0,20
13	Minazel PLUS™	0,20	0,20	0,20
14	AMK Treonin-L (98%)	0,18	0,21	0,14
15	Na bikarbonat	0,10	0,10	0,20
16	Vitamin Holin H 75%	0,06	0,06	0,05
17	Kokcidiostatik	0,05	0,05	/
18	Organska kiselina	0,03	0,03	0,03
19	Esencijalna ulja	/	0,05	0,05

#### 4.1.3 Priprema kontaminirane hrane za ogled

Za pripremu AfB<sub>1</sub> kontaminiranog materijala korišćena je kultura *Aspergillus parasiticus* (CBS 123.62) iz baze u Holandiji (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute). U laboratorijsku staklenu čašu od 2 l odmereno je 1 kg grubo samlevenog kukuruza na Varing mlinu. Čaša sa kukuruzom je prekrivena alufolijom i postavljena u autoklav na sterilizaciju 121°C, 30 minuta. U ohlađen sterilisan kukuruz dodato je 150 ml sterilisane destilovane vode i ostavljeno je da odstoji 30 minuta. Nakon toga dodate su dve Petrijeve ploče sa *A. parasiticus* kulturom (kultivisane na krompirovom dekstroznom agaru 15 dana) a zatim je sadržaj promešan sterilnim štapićem. Staklena posuda je prekrivena perforiranim aluminijumskom folijom. Kontaminirani kukuruz je postavljen u termostat da se inkubira 15 dana na 25°C, sadržaj je svakodnevno aerisan. Nakon inkubacije, kontaminirani kukuruz je ponovo autoklaviran na 121°C u toku 30 minuta, a zatim stavljen u sušnicu na 105°C, 48 h. Kontaminiran materijal je samleven i analiziran na prisustvo i koncentraciju AfB<sub>1</sub> tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa maseno-masenom spektrometrijom (Agilent 6460c LC-MS/MS). U 1kg na ovaj način kontaminiranog kukuruza detektovano je 264 mg AfB<sub>1</sub>.

Za pripremu T-2 toksinom kontaminiranog materijala korišćena je kultura *Fusarium langsethiae* (Fe 2391 referentni materijal kuće). U laboratorijsku staklenu čašu od 2 l odmereno je 1kg grubo samlevenog kukuruza na Varing mlinu. Čaša sa kukuruzom je prekrivena alufolijom i postavljena u autoklav na sterilizaciju 121°C, 30 minuta. U ohlađen sterilisan kukuruz dodato je 150 ml sterilisane destilovane vode i ostavljeno je da odstoji 30 minuta. Nakon toga dodate su četiri Petrijeve ploče *F. langsethiae* (kultivisane na krompirovom dekstroznom agaru 15 dana) i sadržaj je promešan. Staklena posuda je prekrivena perforiranom aluminijumskom folijom. Kontaminirani kukuruz je postavljen u inkubator 10 dana na 10°C i svakodnevno aerisan. Nakon inkubacije, kontaminirani kukuruz je ponovo autoklaviran na 121 °C u toku 30 minuta, a zatim stavljen u sušnicu na 105°C, 48 h. Ovako pripremljen materijal je samleven i analiziran na prisustvo i koncentraciju T-2 toksina tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa maseno-masenom spektrometrijom (Agilent 6460c LC-MS/MS). U 1kg ovako kontaminiranog kukuruza detektovano je 175 mg T-2 toksina.

#### **4.1.4 Preparat za detoksikaciju mikotoksina (MR) korišćen u ogledu**

Multikomponentni preparat za detoksifikaciju mikotoksina (MR) sadrži fizički aktivno jezgro zeolita (modifikovani zeolit-klinoptilolit), spore *Bacillus subtilis*, *Baccillus licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae* (ćelijski zid kvasca) i silimarin (fitogena hepatoprotektivna materija). Ovaj preparat je formulisan tako da ispoljava optimalne efekte kod životinja.

#### **4.1.5 Formiranje ogleđa**

Ogled je izveden na ukupno 96 brojlera podeljenih metodom slučajnog izbora u osam grupa. Kontrolne i ogleđne grupe imale su podjednak broj životinja (po 12).



**Tabela 7. Ishrana oglednih grupa brojlera**

R.br.	Grupa brojlera	Hrana
1	E-I	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,1 mg/kg AfB <sub>1</sub>
2	E-II	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,1 mg/kg AfB <sub>1</sub> + 0,2% MR
3	E-III	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,5 mg/kg T-2 toksina
4	E-IV	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,5 mg/kg T-2 toksina + 0,2% MR
5	E-V	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,1 mg/kg AfB <sub>1</sub> + 0,5 mg/kg T-2 toksina
6	E-VI	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,1 mg/kg AfB <sub>1</sub> + 0,5 mg/kg T-2 toksina + 0,2% MR
7	K	Potpuna smeša za ishranu brojler bez dodataka
8	MR	Potpuna smeša za ishranu brojlera + 0,2% MR

## **4.2 Metode ispitivanja**

Da bi se dobili naučno validni rezultati, primenjivi u praksi, korišćene su savremene tehnike i metode ispitivanja, kao i savremene matematičko statističke metode za obradu i prikazivanje dobijenih rezultata.

### **4.2.1. Zdravstveno stanje**

Pored preventivnog programa zdravstvene zaštite, sve životinje u ogledu bile su pod stalnim veterinarsko-medicinskim nadzorom, a sve promene zdravstvenog stanja svakodnevno su praćene i evidentirane. Svakodnevna opservacija vršena je pojedinačnom i grupnom inspekcijom.

### **4.2.2. Hemijske analize hrane**

Uzorci hrane za predviđena laboratorijska ispitivanja uzimani su na početku svake faze ogleda, odnosno 1. i 21. i 35. dana. Analiziran je hemijski sastav hrane koja je korišćena za ishranu brojlera. Za potrebe ispitivanja korišćene su sledeće standardne metode:

- Određivanje sadržaja sirovih proteina prema metodi SRPS ISO 5983/2001.

- Određivanje sadržaja vlage i drugih isparljivih materija prema metodi SRPS ISO 6496/2001.
- Određivanje sadržaja masti prema metodi SRPS ISO 6492/2001
- Određivanje sadržaja sirovog pepela prema metodi SRPS ISO 5984/2002
- Određivanje sadržaja kalcijuma (volumetrijska metoda) prema SRPS ISO 6490-1/2001.
- Određivanje sadržaja fosfora (spektrometrijska metoda) prema SRPS ISO 6491/2002.
- Određivanje sadržaja sirove celuloze (metoda sa međufiltracijom) prema SRPS ISO 6865/2004.
- Određivanje bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM)

Sadržaj bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM) (%) određen je računski prema formuli:  

$$\text{BEM} = 100 - (\% \text{ vlaga} + \% \text{ pepeo} + \% \text{ celuloza} + \% \text{ proteini} + \% \text{ mast}).$$

- Određivanje sadržaja AfB1 i T-2 toksina u hrani za životinje izvršeno je tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom na aparatu Agilent 6460c LC-MS/MS.

#### 4.2.3. Proizvodni rezultati

Kontrolna merenja oglednih jedinki izvršena su pri useljavanju jednodnevnih brojlera, kao i u sedmodnevnim intervalima do kraja ogleda. Kontrolna merenja oglednih životinja izvršena su na elektronskoj vagi sa tačnošću  $10^{-2}$  g. Na osnovu rezultata merenja izračunavana je prosečna TM na kraju svake nedelje, kao i za ceo ogled zbirno. Na osnovu razlike TM na početku i kraju svake nedelje ogleda izračunavan je ukupan dnevni prirast.

Tokom celog ogleda, u sedmodnevnim intervalima, vršeno je merenje utroška hrane za svaku grupu. Isto tako, na osnovu utrošene hrane i prirasta jedinki u toku ogleda, izračunat je KK hrane za svaku grupu.

Tokom trajanja eksperimentalnog perioda od 42 dana, praćeno je zdravstveno stanje i dinamika uginuća eksperimentalnih životinja.

#### **4.2.4. Makroskopski i HP pregled u tkivima brojlera**

Na kraju eksperimentalnog perioda 42. dana ogleda, neposredno posle žrtvovanja životinja urađena je obdukcija i detaljni makroskopski pregled organa. Nakon makroskopskog pregleda uzorkovana su tkiva duodenuma, jetre, srca i BF za histopatološka ispitivanja. Tkiva su fiksirana u 10% neutralnom puferizovanom formalinu i nakon standardne obrade u automatskom tkivnom procesoru tkiva su ukalupljena u parafinske blokove. Isečci tkiva debljine 3-5  $\mu\text{m}$  su bojeni hematoksilinom i eozinom (HE).

#### **4.2.5. Analize prisustva rezidua AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina i njihovih metabolita u tkivima brojlera**

Za ispitivanje sadržaja rezidua AfB<sub>1</sub>, T-2 toksina, i njihovih metabolita (AfM<sub>1</sub>, HT-2 toksina, T2-triola i T-2 tetraola) u tkivima korišćena je tehnika tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (Agilent 6460c LC-MS/MS).

Uzorci grudne muskulature i jetre su bili homogenizovani u blenderu. Dva grama homogenizovanog uzorka je preliveno sa 10 ml rastvora za ekstrakciju (80% acetonitril: 15% voda: 5% mravlja kiselina), potom je smeša postavljena na orbitalnu mešalicu u toku 1 sata na sobnoj temperaturi, da bi se izvršila ekstrakcija mikotoksina. Nakon ekstrakcije, uzorci su stavljeni u centrifugu 4200 obrtaja/minuti, tokom pet minuta. Iz bistrog dela ekstrakta odvojeno je 7 ml tečnosti u novu tubu i dodato je 2,8 g MgSO<sub>4</sub> i 0,7 g NaCl. Postupak je nastavljen energičnim mešanjem u vorteksu u toku 60 sekundi. Uzorci su ponovo centrifugirani (5 minuta na 4200 obrtaja/minuti). Iz bistrog dela rastvora uzeto je 1 ml u staklenu vialu, na to je dodato 250  $\mu\text{l}$  vode i promešano. Dodatno prečišćavanje ekstrakta od masti (fosfolipida) je urađeno na EMR Captiva kolonici, 1,25 ml ekstrakta je uz pomoć gravitacione sile propušteno kroz kolonicu. Odmašćeni ekstrakt je uparen do suvog u evaporatoru (40°C, 1500 obrtaja/min.) i rekonstituisan sa 500  $\mu\text{l}$  rastvora za rekonstituciju (50% acetonitril: 50% voda i 0,1% mravlja kiselina). Tako pripremljen uzorak je profiltriran preko najlonskog špric filtera (0,22  $\mu\text{m}$ ) u čistu staklenu vialu i analiziran LC MS/MS tehnikom. Analitička kolona korišćena za razdvajanje analita je Agilent ZORBAX Rapid Resolution (Agilent, Palo Alto, CA, USA) HD 2.1  $\times$  50 mm 1,8  $\mu\text{m}$  sa predkolonom ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ . Uslovi za hromatografiju, mobilne faze, vreme i protok u ml/min. dati su tabeli 8.

**Tabela 8. Gradijentni program tečnog hromatografa:**

Vreme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)	Tok (ml/min)
0,00	88	12	0,2
5,00	88	12	0,2
5,01	50	50	0,2
16,00	0	100	0,2
17,00	0	100	0,2
17,01	88	12	0,2

Određivanje masenog udela mikotoksina:

$$C \text{ mikotoksin } (\mu\text{g/kg}) = (C \times V_R \times V) / m$$

gde je:

C – određena koncentracija mikotoksina (ng/ml);

V<sub>r</sub> – zapremina rekonstitucije (0,5 ml);

V – zapremina acetonitrila (8 ml) u delu za ekstrakciju;

M – količina uzorka

#### 4.2.6. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati razvrstani su u odgovarajuće statističke serije i obrađeni uz primenu programa GraphPad Prism 8.0, čime je omogućeno objektivno i egzaktno zaključivanje.

Za statističku analizu korišćene su sledeće metode: mere varijacije i metod analize varijanse sa neparnim t testom i Tykey test.

Izračunavani su sledeći statistički parametri: aritmetička sredina ( $\bar{X}$ ), standardna greška (SE), standardna devijacija (Sd), koeficijent varijacije (Cv) i interval varijacije (Iv). Mere varijacije su omogućile da se prati varijabilitet unutar svakog obeležja, kako apsolutno tako i relativno, a preko koeficijenta varijacije i poređenja varijacija između obeležja. Međusobno poređenje svih tretmana vršeno je metodom analize varijanse "F" testom. Korišćenjem Tykey i t-testa vršena je dalja analiza statističke značajnosti razlika između pojedinih tretmana. Svi testovi su korišćeni na nivou rizika od 5% i 1% i 0,1%, pa su prema tome i zaključci dati sa odgovarajućom verovatnoćom (95, 99 i 99,99%).

Dobijeni i obrađeni rezultati prikazani su u vidu tabela, grafikona i slika.

## 5. REZULTATI

U ovom poglavlju prikazani su rezultati oglada dobijeni hemijskim i toksikološkom analizama potpunih smeša za ishranu brojlera u ogledu, proizvodni rezultati, rezultati makroskopskih i histopatoloških ispitivanja duodenuma, jetre, srca i BF, kao i rezultati ispitivanja prisustva rezidua AfB<sub>1</sub>, T-2 toksina i njihovih metabolita u grudnoj muskulaturi i jetri oglednih životinja.

### 5.1. HEMIJSKI SASTAV SMEŠA

Hemijski sastav potpunih smeša korišćenih za ishranu brojlera u ogledu prikazan je u tabeli 9. Rezultati pokazuju da su smeše u potpunosti odgovarale kategorijama brojlera kojima su namenjene kao i normativima za ishranu, u odnosu na provenijencu brojlera.

**Tabela 9. Hemijski sastav smeša za ishranu brojlera**

R. br.	Hemijski sastav %	I	II	III
1	Sirovi protein	22,50	19,30	18,01
2	Sirove masti	4,55	5,60	5,60
3	Sirovi pepeo	6,07	5,74	5,30
4	Sirova celuloza	3,26	3,29	3,18
5	ME Živina, kalkulatивно MJ/kg	12,89	13,27	13,42
6	Lizin	1,28	1,20	0,98
7	Metionin	0,65	0,59	0,49
8	Metionin+Cistin	0,95	0,87	0,77
9	Treonin	0,86	0,77	0,67
10	Triptofan	0,24	0,19	0,18
11	Kalcijum	0,93	0,87	0,87
12	Fosfor, ukupni	0,59	0,59	0,54
13	Fosfor, iskoristivi	0,30	0,30	0,26
14	Natrijum	0,16	0,26	0,16

**Tabela 10. Rezultati toksikoloških ispitivanja koncentracije AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina u smešama za ishranu brojlera**

R.br.	Grupe	AfB <sub>1</sub>	T-2
1	E-I, početna smeša	99,3	-
2	E-I, smeša za porast	97,2	-
3	E-I, završna smeša	101,2	-
4	E-II, početna smeša	97,2	-
5	E-II, smeša za porast	98,5	-
6	E-II, završna smeša	103	-
7	E-III, početna smeša	-	498
8	E-III, smeša za porast	-	511
9	E-III, završna smeša	-	514
10	E-IV, početna smeša	-	444
11	E-IV, smeša za porast	-	503
12	E-IV, završna smeša	-	505
13	E-V, početna smeša	102	496
14	E-V, smeša za porast	105	510
15	E-V, završna smeša	98,4	497
16	E-VI, početna smeša	96,8	489
17	E-VI, smeša za porast	97,9	502
18	E-VI, završna smeša	103	501
19	K, početna smeša	-	-
20	K, smeša za porast	-	-
21	K, završna smeša	-	-
22	MR, početna smeša	-	-
23	MR, smeša za porast	-	-
24	MR, završna smeša	-	-

Toksikološkim ispitivanjima smeša proveren je stepen umešanosti kontaminiranog materijala sa AfB<sub>1</sub> i T-2 toksinom u hranu za brojlere. Toksikološka ispitivanja su pokazala veoma dobar stepen umešanosti kontaminiranog materijala AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina u komercijalnu hranu sa dozvoljenim odstupanjem od  $\pm 2\%$ .

## 5.2. OGLED NA BROJLERIMA

### 5.2.1. Proizvodni rezultati brojlera

TM brojlera u ogledu po fazama prikazane su u tabeli 11., dok su statističke značajnosti u dobijenim rezultatima prikazani u prilogu 1. Iz rezultata se vidi da su brojleri prvog dana ogleda imali odgovarajuću TM za provinijencu, dok razlike u TM između grupa nisu bile statistički značajne (Prilog 1).

**Tabela 11. Prosečne telesne mase brojlera (g) kontrolnih grupa tokom dana ogleda, ( $\bar{x} \pm Sx$ )**

Grupe	1 dan	7 dan	14 dan	21 dan	28 dan	35 dan	42 dan
<b>E-I</b>	52,92 ± 0,73	130,8 ± 1,87 aaa	339,5 ± 2,47 aaa	627,8 ± 2,93 aaa	935,8 ± 3,08 aaa	1326,0 ± 7,52 aaa	1826,0 ± 12,64 aaa
<b>E-II</b>	51,58 ± 0,78	172,2 ± 2,7 bbb	387,8 ± 2,21 aaa,bbb	690,8 ± 2,61 aaa,bbb	1032,0 ± 7,20 aaa,bbb	1472,0 ± 2,81 aaa,bbb	2055,0 ± 10,26 aaa,bbb
<b>E-III</b>	51,83 ± 0,86	130,7 ± 1,75 aaa,ccc	339,9 ± 2,69 aaa,ccc	626,6 ± 3,77 aaa,ccc	940,1 ± 3,51 aaa,ccc	1326,0 ± 8,96 aaa,ccc	1828,0 ± 13,31 aaa,ccc
<b>E-IV</b>	51,58 ± 0,67	167,8 ± 2,15 bbb,ddd	386,7 ± 2,23 aaa,bbb,ddd	688,5 ± 2,71 aaa,bbb,ddd	1034,0 ± 8,88 aaa,bbb,ddd	1472,0 ± 3,57 aaa,bbb,ddd	2054,0 ± 7,98 aaa,bbb,ddd
<b>E-V</b>	51,58 ± 0,78	121,7 ± 2,0 aaa,ccc,eee	316,9 ± 1,61 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	589,8 ± 4,35 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	834,2 ± 3,63 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	1215,0 ± 3,95 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	1692,0 ± 1,91 aaa,bbb,ccc,ddd,eee
<b>E-VI</b>	51,50 ± 0,87	128,0 ± 1,85 aaa,ccc,eee	325,7 ± 3,68 aaa,bb,ccc,dd,eee,fff	602,3 ± 2,86 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	869,3 ± 3,34 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff	1255,0 ± 4,70 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff	1742,0 ± 4,91 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff
<b>K</b>	51,33 ± 0,89	173,9 ± 2,37	431,3 ± 2,46	791,2 ± 3,24	1235,0 ± 3,59	1808,0 ± 8,80	2336,0 ± 7,35
<b>MR</b>	51,33 ± 0,68	182,6 ± 2,58 bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	458,4 ± 2,72 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	831,4 ± 2,50 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	1304,0 ± 2,68 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	1898,0 ± 3,03 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	2542,0 ± 9,36 aaa,bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg g

a - statistički značajna razlika u odnosu na K grupu (a=P<0,05 aa=P<0,01 aaa=P<0,001)

b - statistički značajna razlika u odnosu na O-I (b=P<0,05 bb=P<0,01 bbb=P<0,001)

c - statistički značajna razlika u odnosu na O-II (c=P<0,05 cc =P<0,01 ccc =P<0,001)

d - statistički značajna razlika u odnosu na O-III (d=P<0,05 dd=P<0,01 ddd=P<0,001)

e - statistički značajna razlika u odnosu na O-IV (e=P<0,05 ee=P<0,01 eee=P<0,001)

f - statistički značajna razlika u odnosu na O-V (f=P<0,05 ff=P<0,01 fff=P<0,001)

g - statistički značajna razlika u odnosu na O-VI (g=P<0,05 gg=P<0,01 ggg=P<0,001)

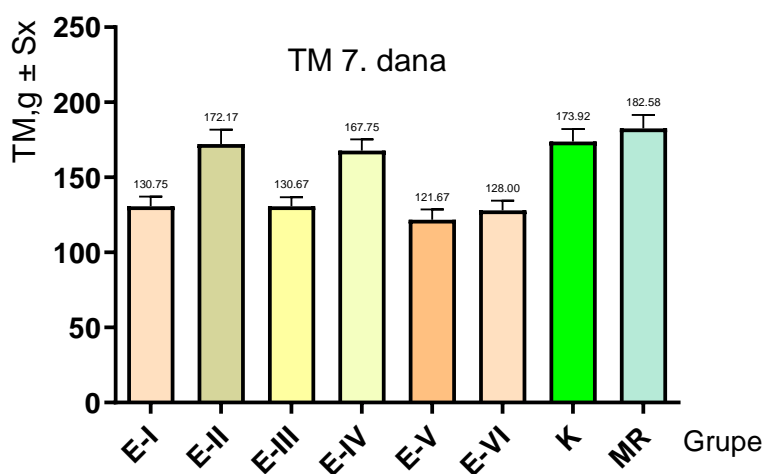
h - statistički značajna razlika u odnosu na K+MR (h=P<0,05 hh=P<0,01 hhh=P<0,001)

Prvog dana ogleda nije bilo statistički značajnih razlika između brojlera kontrolnih i oglednih grupa.



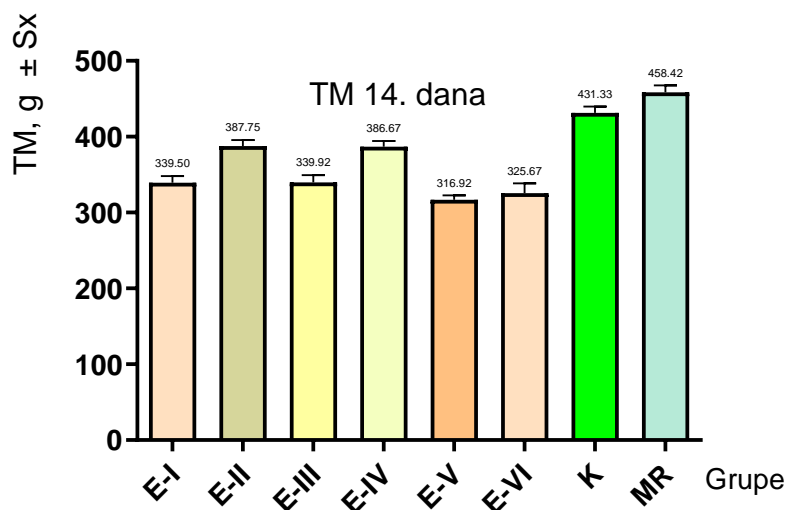
Sedmog dana oglada zabeležene su statistički značajne razlike između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> (E-I) 130,8 ± 1,87g i brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% MR (E-II) 172,2 ± 2,7g. Isto tako, statistički značajne razlike zabeležene su između TM oglednih životinja koje su u hrani dobijale 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-III) 130,7 ± 1,75g i oglednih životinja koje su hranom dobijale 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR (E-IV) 167,8 ± 2,15g. U istom eksperimentalnom periodu TM brojlera kontrolnih grupa (K, MR) bile su statistički značajno više od TM brojlera E-I, E-III i E-V grupa.

Takođe, tokom ovog perioda prosečna TM brojlera koji su hranom dobijali ispitivani preparat (MR) bila je viša od TM brojlera kontrolne grupe (K), ali razlika nije bila statistički značajna.



**Grafikon 1. Telesne mase brojlera oglednih i kontrolnih grupa 7. dana oglada**

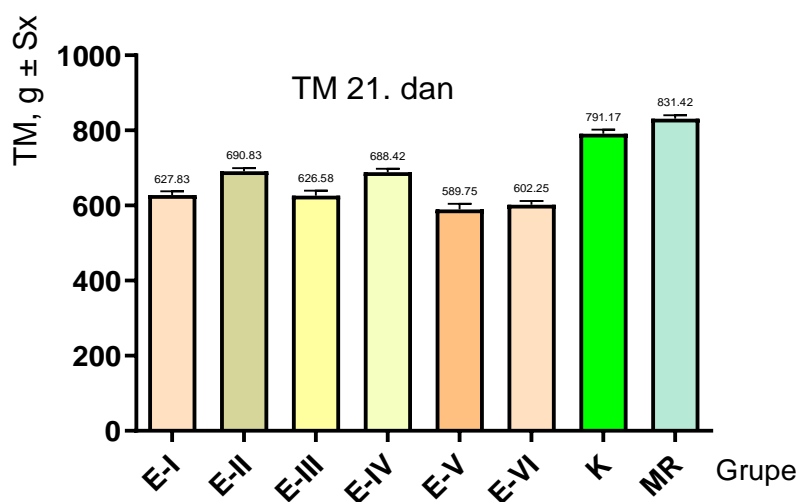
Četrnaestog dana oglada zapažene su statistički značajne razlike između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> (E-I) 339,5 ± 2,47g i brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak ispitivanog preparata (E-II) 387,8 ± 2,21g. Takođe, statistički značajne razlike su primećene između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-III) 339,9 ± 2,69g i oglednih životinja koje su hranom dobijale 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak preparata MR (E-IV) 386,7 ± 2,23g. Posmatranjem TM životinja kontrolnih grupa (K, MR) zapaženo je da su bile signifikantno više od TM brojlera E-I, E-III i E-V grupa. Interesantno je napomenuti da je u ovom periodu prosečna TM oglednih životinja kontrolne grupe koje su sa hranom dobijale ispitivani preparat (MR) 458,4 ± 2,72g bila statistički značajno viša od TM brojlera (K) 431,3 ± 2,46g.



**Grafikon 2. Telesne mase brojlera oglednih i kontrolnih grupa 14. dana ogleda**

Dvadeset prvog dana ogleda uočene su statistički značajne razlike između TM oglednih životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> (E-I)  $627,8 \pm 2,93$ g i brojlera koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak izabranog preparata (E-II)  $690,8 \pm 2,61$ g. Isto tako, statistički značajne razlike su zabeležene između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-III)  $626,6 \pm 3,77$ g i brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak ispitivanog preparata MR (E-IV)  $688,5 \pm 2,71$ g.

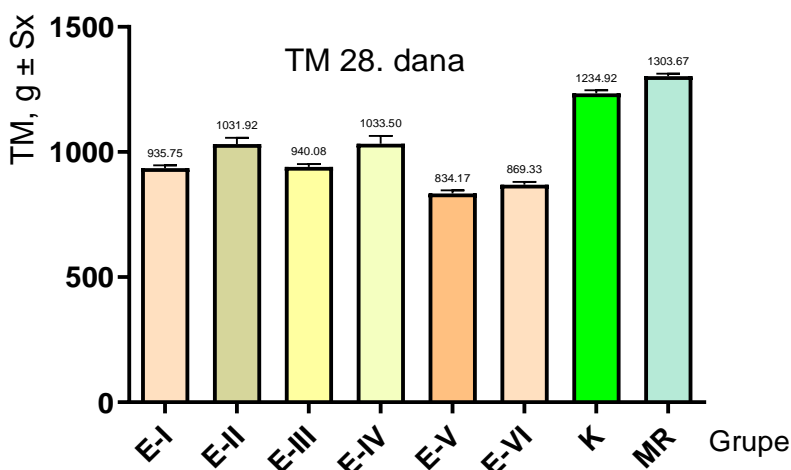
Takođe, TM brojlera kontrolnih grupa (K, MR) bile su statistički značajno više od TM brojlera E-I, E-III i E-V grupa. Važno je napomenuti da je u ovom oglednom periodu prosečna TM životinja koje su sa hranom dobijale ispitivani preparat (MR)  $831,4 \pm 2,50$ g bila statistički značajno viša od brojlera (K) grupe  $791,2 \pm 3,24$ g.



**Grafikon 3. Telesne mase brojlera oglednih i kontrolnih grupa 21. dana ogleda**

Dvadeset osmog dana oglada primećene su statistički značajne razlike između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> (E-I)  $935,8 \pm 3,08$ g i brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% preparata MR  $1032,0 \pm 7,20$ g. Takođe, statistički značajne razlike su registrovane između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-III)  $940,1 \pm 3,51$ g i životinja koje su hranom dobijale 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% preparata MR (E-IV)  $1034,0 \pm 8,88$ g.

U ovom periodu zapažene su statistički značajne razlike između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-V)  $834,2 \pm 3,63$ g kao i grupe brojlera koja je hranom dobijala 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR preparata (E-VI)  $869,3 \pm 3,34$ g. Posmatranjem TM oglednih životinja iz kontrolnih grupa (K, MR) uočeno je da su bile signifikantno više od TM brojlera E-I, E-III i E-V grupa. Interesantno je napomenuti da je u ovom eksperimentalnom periodu prosečna TM životinja koje su hranom dobijale ispitivani preparat (MR)  $1304,0 \pm 2,68$ g bila statistički značajno viša od brojlera (K) grupe  $1235,0 \pm 3,59$ g.

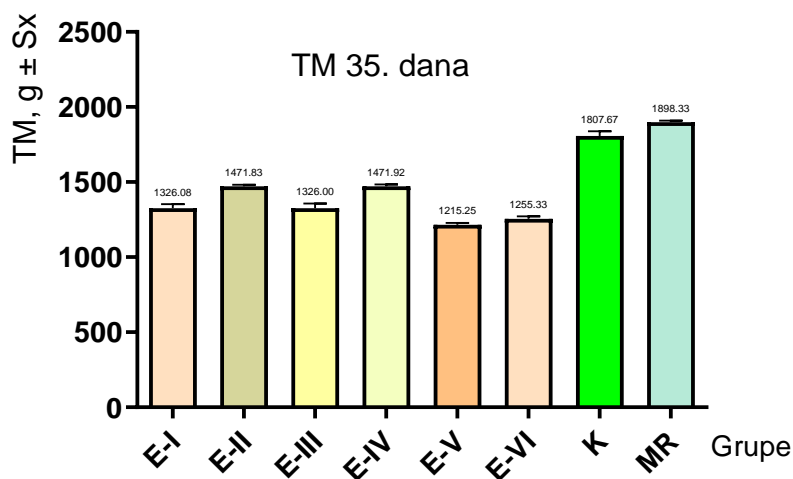


**Grafikon 4. Telesne mase brojlera oglednih i kontrolnih grupa 28. dana oglada**

Trideset petog dana oglada uočene su statistički značajne razlike između TM životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> (E-I)  $1326,0 \pm 7,52$ g i životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak preparata MR (E-II)  $1472,0 \pm 2,81$ g. Isto tako, statistički značajne razlike su zabeležene između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-III)  $1326,0 \pm 8,96$ g i brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR (E-IV)  $1472,0 \pm 3,57$ g.

U ovom ispitivanom periodu zapažene su statistički značajne razlike između TM životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-V)  $1215,0 \pm 3,95$ g i životinja

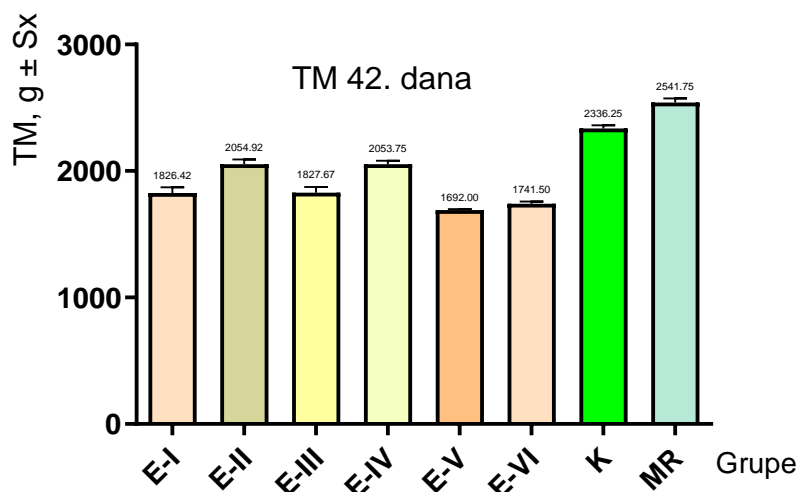
koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak izabranog preparata MR (E-VI) 1255,0 ± 4,70g. Posmatranjem TM oglednih životinja kontrolnih grupa (K, MR) zapaženo je da su bile signifikantno više od TM brojlera oglednih E-I, E-III i E-V grupa. Značajno je napomenuti da je u ovom istom oglednom periodu prosečna TM brojlera koji su hranom dobijali ispitivani preparat (MR) 1898,0 ± 3,03g bila statistički značajno viša od oglednih životinja koje su dobijale hranu bez dodataka (K) grupa 1808,0 ± 8,80g.



**Grafikon 5. Telesne mase brojlera oglednih i kontrolnih grupa 35. dana ogleda**

Četrdeset drugog dana ogleda uočene su statistički značajne razlike između TM životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> (E-I) 1826,0 ± 12,64g i životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% MR (E-II) 2055,0 ± 10,26g. Isto tako, signifikantno značajne razlike su se pojavile između TM brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-III) 1828,0 ± 13,31g i brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR (E-IV) 2054,0 ± 7,98g.

U ovom istom periodu zapažene su statistički značajne razlike između TM životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina (E-V) 1692,0 ± 1,91g i životinja koje su hranom dobijale 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% MR (E-VI) 1742,0 ± 4,91g. Tokom istog oglednog perioda, posmatranjem TM brojlera kontrolnih grupa (K, MR) zapaženo je da su bile signifikantno više od TM brojlera E-I, E-III i E-V grupa. Zanimljivo je pomenuti da je u ovom periodu ogleda prosečna TM brojlera koje su hranom dobijale ispitivani preparat (MR) 25424,0 ± 9,36g bila signifikantno viša od brojlera koji su hranjeni hranom bez dodataka (K) grupa 2336,0 ± 7,35g.



**Grafikon 6. Telesne mase brojlera oglednih i kontrolnih grupa 42. dana ogleda**

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je u pogledu TM brojlera tokom ogleda, ispitivani preparat (MR) pokazao značajan protektivni efekat. Brojleri grupa koji su uz ispitivani preparat (MR) dobijali AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin ili kombinaciju ova dva toksina ostvarili su statistički značajno više TM tokom celog ogleda. Takođe, počevši od druge nedelje ogleda brojleri grupe koja je uz komercijalnu hranu dobijala ispitivani preparat imali su statistički značajno više TM u odnosu na sve ogledne i kontrolnu grupu brojlera. Taj trend zadržao se do kraja ogleda.

TM je dobar pokazatelj kvaliteta hrane ali se smatra da je prirast pouzdanije karakteriše ovaj parametar, a posebno higijensku ispravnost i zdravstveno stanje životinja. Ostvaren prosečan dnevni prirast brojlera kontrolne grupe tokom ogleda bio je u granicama predviđenim tehnološkim normativima. Brojleri (E-I, E-III, E-V, E-VI) grupa postigle su statistički značajno niže priraste u odnosu na kontrolne grupe (K, MR).

Prosečni prirast brojlera u ogledu po fazama prikazan je u tabeli 12., dok su statističke značajnosti u dobijenim rezultatima prikazani u prilogu 2. Iz rezultata se vidi da su brojleri prvog dana ogleda imali odgovarajuću TM za provinijencu, dok razlike u TM između grupa nisu bile statistički značajne (Prilog 2).

**Tabela 12. Prosečan dnevni prirast brojlera (g) tokom ogleda (  $\bar{X} \pm S_x$  )**

	<b>1-7. dan</b>	<b>7-14. dan</b>	<b>14-21. dan</b>	<b>21-28. dan</b>	<b>28-35. dan</b>	<b>35-42. dan</b>	<b>1-42. dan</b>
E-I	6,48 ± 0,17 aaa	17,40 ± 0,11 aaa	24,02 ± 0,24 aaa	25,45 ± 0,33 aaa	32,52 ± 0,61 aaa	41,69 ± 1,26 aaa	147,6 ± 0,99 aaa
E-II	10,05 ± 0,28 bbb	17,96 ± 0,23 aaa	25,25 ± 0,19 aaa	28,42 ± 0,54 aaa,bb	36,65 ± 0,61 aaa,bbb	48,59 ± 0,91 aa,bbb	167 ± 0,85 aaa,bbb
E-III	6,56 ± 0,15 aaa,ccc	17,44 ± 0,25 aaa,d	23,89 ± 0,40 aaa	26,12 ± 0,52 aaa,c	32,15 ± 0,86 aaa,ccc	41,8 ± 1,12 aaa,ccc	148,0 ± 1,12 aaa,ccc
E-IV	9,68 ± 0,21 bbb,ddd	18,24 ± 0,21 aaa	25,15 ± 0,34 aaa	28,75 ± 0,77 aaa,bbb,ddd	36,53 ± 0,85 aaa,bb,ddd	44,75 ± 0,77 aaa,bbb,ddd	166,8 ± 0,68 aaa,bbb,ddd
E-V	5,91 ± 0,25 aaa,ccc,eee,	16,19 ± 0,25 aaa,ccc,eee	22,73 ± 0,39 aaa,ccc,eee	18,8 ± 0,46 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	31,75 ± 0,46 aaa,ccc,eee	39,73 ± 0,28 aaa,ccc,eee	137,1 ± 0,43 aaa,bbb,ccc,ddd, eee, g
E-VI	6,37 ± 0,13 aaa,ccc,eee	16,47 ± 0,36 aaa,cc,eee	23,05 ± 0,43 aaa,ccc,ee	22,25 ± 0,34 aaa,bbb,ccc,ddd,eee	32,16 ± 0,39 aaa,ccc,eee	40,51 ± 0,70 aaa,ccc,eee	140,9 ± 0,42 aaa,bbb,ccc,ddd, eee
K	10,21 ± 0,19	21,45 ± 0,33	29,98 ± 0,29	36,98 ± 0,39	47,73 ± 0,81	44,05 ± 1,03	190,4 ± 0,61
MR	10,94 ± 0,23 bbb,ccc, ddd,ee,fff,ggg	22,98 ± 0,35 bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	31,08 ± 0,32 bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	39,35 ± 0,31 bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	49,55 ± 0,39 bbb,ccc,ddd,eee,fff,ggg	53,61 ± 0,70 aaa,bbb,ddd,fff, ggg	207,5 ± 0,80 bbb,ccc,ddd, eee,fff,ggg

a - statistički značajna razlika u odnosu na K grupu (a=P<0,05 aa=P<0,01 aaa=P<0,001)

b - statistički značajna razlika u odnosu na E-I (b=P<0,05 bb=P<0,01 bbb=P<0,001)

c - statistički značajna razlika u odnosu na E-II (c=P<0,05 cc =P<0,01 ccc =P<0,001)

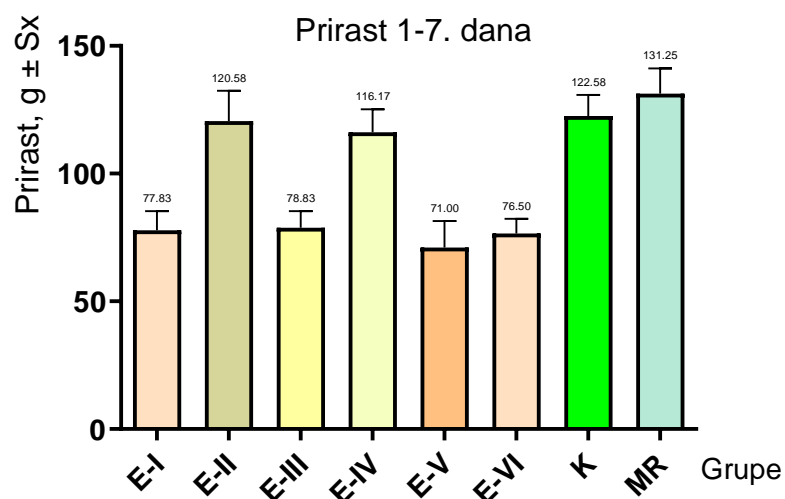
d - statistički značajna razlika u odnosu na E-III (d=P<0,05 dd=P<0,01 ddd=P<0,001)

e - statistički značajna razlika u odnosu na E-IV (e=P<0,05 ee=P<0,01 eee=P<0,001)

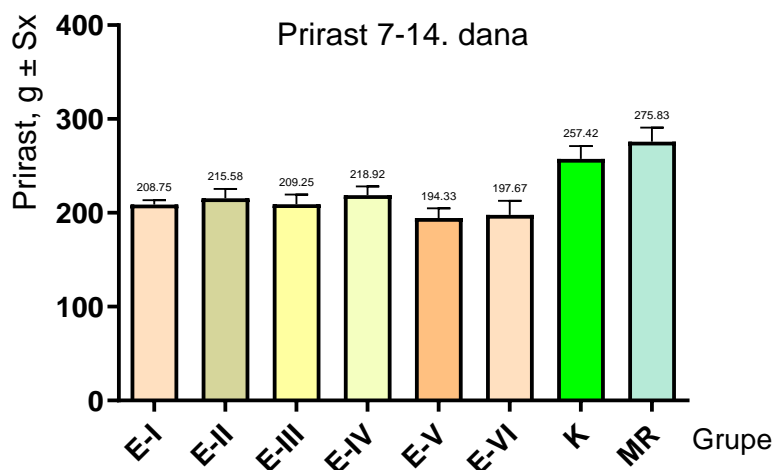
f - statistički značajna razlika u odnosu na E-V (f=P<0,05 ff=P<0,01 fff=P<0,001)

g - statistički značajna razlika u odnosu na E-VI (g=P<0,05 gg=P<0,01 ggg=P<0,001)

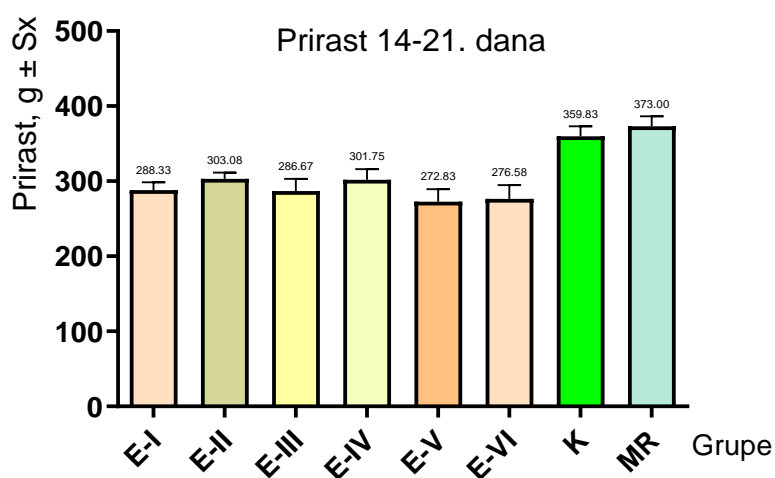
h - statistički značajna razlika u odnosu na K+MR (h=P<0,05 hh=P<0,01 hhh=P<0,001)



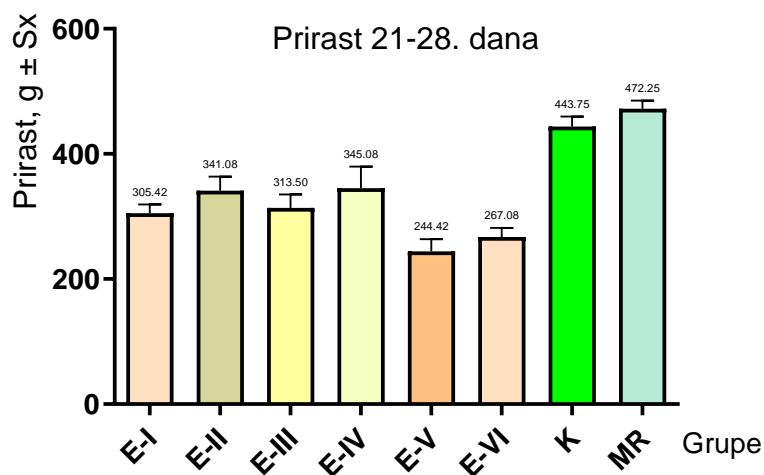
Grafikon 7. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 1-7. dana ogleđa



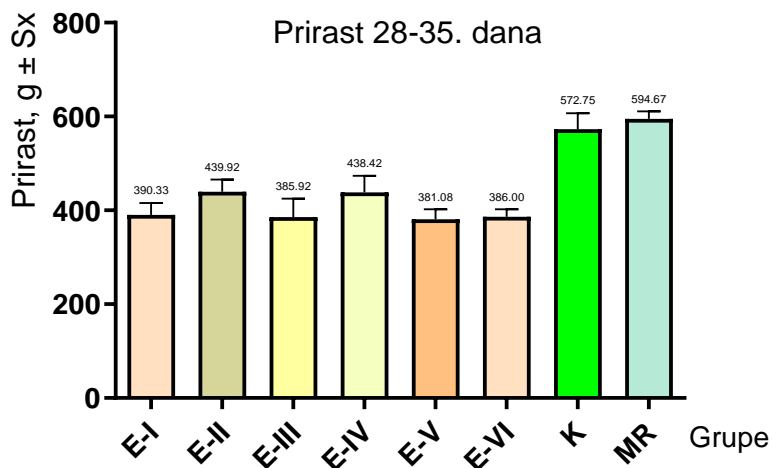
Grafikon 8. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 7-14. dana ogleđa



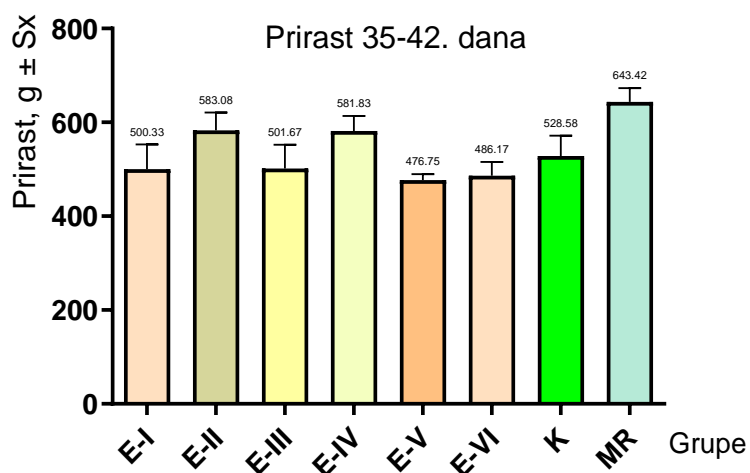
Grafikon 9. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 14-21. dana ogleđa



Grafikon 10. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 21-28. dana ogleđa

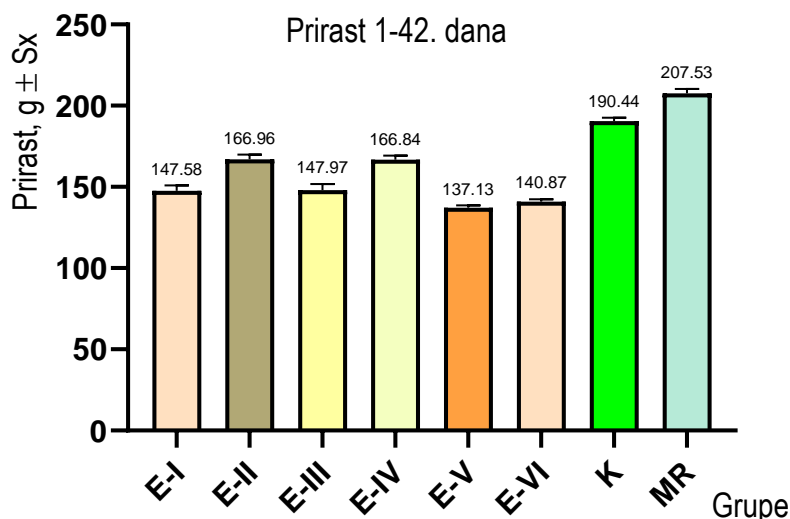


Grafikon 11. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 28-35. dana ogleđa



Grafikon 12. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 35-42. dana ogleđa





**Grafikon 13. Dnevni prirast brojlera oglednih i kontrolnih grupa 1-42. dana ogleda**

Brojleri ogledne grupe E-I imali su statistički značajno niži prirast (g) u toku prve, četvrte, pete i šeste nedelje ispitivanja za 35,5; 10,45; 11,27 i 14,20% u odnosu na brojlere ogledne grupe E-II. Isto tako, brojleri ogledne grupe E-III imali su statistički značajno manji prirast (g) u toku prve, četvrte, pete i šeste nedelje ogleda za 32,23; 9,15; 11,99 i 6,59% u odnosu na brojlere ogledne grupe E-IV.

Brojleri ogledne grupe E-II imali su signifikantno viši prirast (g) u toku druge, treće, četvrte, pete i šeste nedelje eksperimenta za 8,30; 8,71; 21,71; 12,25 i 16,63% u odnosu na brojlere ogledne grupe E-VI. Isto tako, brojleri ogledne grupe E-IV imali su viši prirast (g) tokom druge, treće, četvrte, pete i šeste nedelje eksperimenta za 9,70; 8,35; 22,60; 11,96 i 9,47% u odnosu na brojlere ogledne grupe E-VI. U istom periodu ispitivanja registrovan je statistički značajno viši prirast (g) brojlera ogledne grupe E-III za 7,16; 4,85; 28,02; 1,24 i 4,95% u odnosu na brojlere ogledne grupe E-V.

Iz navedenih rezultata prirasta može se konstatovati da su sve grupe koje su dobijale samo toksin imale značajno niže priraste u odnosu na grupe koje su uz toksin dobijale i ispitivani preparat. Povezujući proizvodne rezultate i prirast između oglednih i kontrolnih grupa, uočava se da je izabrani preparat pokazao protektivni efekat.

Posmatrajući zbirno za ceo ogled od 1.- 42. dana brojleri E-I grupe ostvarili su prosečan dnevni prirast od  $147,66 \pm 0,99$  g, dok su brojleri E-II grupe koji su uz AfB<sub>1</sub> dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju MR ostvarili za ceo period ogleda prosečan dnevni prirast od  $167 \pm 0,85$  g. Između prirasta brojlera ove dve grupe detektovana je statistička značajnost na nivou ( $P < 0,001$ ) Na osnovu ovoga možemo zaključiti da su brojleri E-II grupe ostvarili za 13,09% više dnevne priraste tokom celog ogleda, što se može pripisati učinku preparata MR. Ipak do kraja ogleda brojleri E-II grupe nisu dostigli priraste predviđene normativom za provinijencu i zbog toga konstatujemo da je protektivni

efekat preparata delimičan. Sličan trend zabeležen je i kod brojlera E-III i E-IV grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane i takođe, uz 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane i 0,2% preparata MR. Brojleri E-III grupe posmatrano za ceo ogled od 1.-42. dana ostvarili su prosečan dnevni prirast od  $148 \pm 1,12$  g dok su brojleri E-IV grupe koji su uz T-2 toksin dobijali 0,2% preparata MR ostvarili za 12,7% više priraste u odnosu brojlere E-III grupe ili  $166,83 \pm 0,68$  g. Između prirasta brojlera E-III i E-IV grupa zabeležena je statistički značajna razlika na nivou ( $P < 0,001$ ). Najniže dnevne priraste posmatrano za ceo period ogleda ostvarili su brojleri E-V i E-VI grupe koji su hranom dobijali kombinaciju AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina kao i kombinaciju oba mikotoksina i preparat za detoksikaciju MR. Brojleri E-V i E-VI grupe ostvarili su od 1.- 42. dana prosečne dnevne priraste od  $137,1 \pm 0,43$  g odnosno  $140,9 \pm 0,43$  g. Iako je numerička razlika u ostvarenim prirastima mala, detektovana je statistički značajna razlika na nivo ( $P = 0,0222$ ). Razlozi su sa jedne strane, negativni efekti oba mikotoksina na TM i prirast, sa druge strane brojleri E-V i E-VI grupe konzumirali su značajno niže količine hrane u odnosu na brojlere grupa koji su hranom dobijali pojedinačno AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin. Zbog snažnog sinergističkog negativnog efekta oba toksina na prirast brojlera ovih grupa, zabeleženo je samo neznatno povećanje prosečnog dnevnog prirasta kod brojlera E-VI grupe. Prosečno najviše dnevne priraste tokom ogleda ostvarili su brojleri MR grupe koji su dobijali hranu sa dodatkom 0,2% preparata MR i to  $207,5 \pm 0,80$  g (od 1. do 42. dana ogleda) kao i brojleri K grupe koji su dobijali komercijalnu hranu bez dodataka i to  $190,4 \pm 0,61$  g. Ove razlike su tokom četvrte i šeste nedelje kao i posmatrano zbirno za ceo ogled, bile statistički značajne na nivou  $P < 0,05$  i  $P < 0,001$  u odnosu na brojlere K grupe, koji su dobijali komercijalnu hranu bez dodataka. Ovakvi rezultati brojlera MR grupe mogu se pripisati uticaju preparata koji osim adsorbivnih komponenti (za adsorbciju mikotoksina) sadrži i probiotske kulture mikroorganizama i fikofitne materije koje potencijalno mogu delovati pozitivno na imunski sistem i zdravlje gastrointestinalnog trakta brojlera.

Dnevna konzumacija hrane tokom ogleda prikazana je u tabeli 13. Brojleri kontrolnih grupa (K, MR) konzumirali su normativom uobičajene količine hrane. S druge strane, ogledne grupe brojlera konzumirale su značajno niže količine hrane u odnosu na ogledne grupe koje su hranom uz toksine dobijale i 0,2% ispitivanog preparata MR.

**Tabela 13. Prosečna dnevna konzumacija hrane po periodima ogleda (g)**

	1-7 dan	7-14 dan	14-21 dan	21-28 dan	28-35 dan	35-42 dan	1-42 dan
<b>E-I</b>	45,23	69,59	81,88	103,88	133,72	122,27	92,83
<b>E-II</b>	47,58	70,07	82,28	117,76	151,58	131,71	100,20
<b>E-III</b>	47,64	63,53	76,48	101,85	139,83	128,76	93,01
<b>E-IV</b>	46,57	71,52	81,84	119,96	149,39	131,35	100,06

<b>E-V</b>	44,27	52,58	69,97	95,16	119,17	110,95	82,01
<b>E-VI</b>	45,42	57,79	71,61	95,33	120,94	115,88	84,44
<b>K</b>	47,82	73,67	86,32	110,92	141,83	126,97	97,92
<b>MR</b>	50,44	74,15	87,08	112,02	153,72	127,39	100,8

Brojleri oglednih grupa (E-I, E-III, E-V) konzumirali su od 1. do 21. dana oglada za 5,5; 10,6 i 24,5% manje hrane u odnosu na brojlere kontrolne grupe koji su dobijali samo komercijalnu hranu (K). U ispitivanom periodu od 21. do 42. dana, brojleri oglednih grupa (E-I, E-III, E-V) konzumirali su za 5,5; 2,5 i 16,74% manje hrane u odnosu na brojlere kontrolne grupe koji su dobijali samo komercijalnu hranu. Brojleri oglednih grupa (E-II, E-IV, E-VI) konzumirali su od 1. do 21. dana oglada za 5,85; 5,85 i 21,05% manje hrane u odnosu na brojlere kontrolne grupe koja je dobijala komercijalnu hranu uz dodatak ispitivanog preparata (MR). U periodu od 21. do 42. dana, brojleri ogledne grupe (E-VI) konzumirali su za 18,36% manje hrane u odnosu na brojlere kontrolne grupe koji su dobijali komercijalnu hranu uz dodatak izabranog adsorbenta (MR).

Brojleri grupa (E-I i E-V) konzumirali su za 7,39 i 2,93 % manje hrane u odnosu na brojlere E-II i E-VI koji su hranom uz toksine dobijali ispitivani preparat MR.

KK hrane je dobar pokazatelj uspešnosti i ekonomske opravdanosti tova. KK bio je niži kod brojlera kontrolnih grupa u odnosu na ogledne grupe (Tabela 14). Brojleri koji su hranom dobijali AfB<sub>1</sub> (E-I) ili T-2 toksin (E-III) imali su najviši KK, 2,2 kg, dok su nešto niže KK hrane ostvarili brojleri koji su hranom dobijali AfB<sub>1</sub> uz dodatak ispitivanog preparata MR (E-II) ili brojleri koji su hranom dobijali T-2 toksin sa dodatkom izabranog preparata MR (E-IV). Kod grupa brojlera koja su hranom dobijala 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina rezultati KK iznosili su 2,1 kg za obe grupe (E-V i E-VI), što je nešto niže u odnosu na brojlere E-I i E-III grupe. Razlog je verovatno kumulativni efekat dva toksina, pa su obe grupe (E-V i E-VI) konzumirale nešto niže količine hrane u odnosu na brojlere E-I i E-III grupe.

Najbolje rezultate KK ostvarila je grupa koja je uz komercijalnu hranu dobijala i ispitivani preparat MR.

**Tabela 14. Konverzija hrane tokom oglada (kg)**

	<b>Konverzija hrane 1-21 dan</b>	<b>Konverzija hrane 21-42 dan</b>	<b>Konverzija hrane 1-42 dan</b>
<b>E-I</b>	2,4	2,1	2,2
<b>E-II</b>	2,2	2,0	2,1
<b>E-III</b>	2,3	2,1	2,2
<b>E-IV</b>	2,2	2,0	2,1
<b>E-V</b>	2,2	2,0	2,1
<b>E-VI</b>	2,2	2,0	2,1
<b>K</b>	1,9	1,7	1,8
<b>MR</b>	1,9	1,6	1,7

## **5.2.2. Zdravstveno stanje brojlera tokom oglada**

Brojleri kontrolne grupe kao i grupa koje su dobijale hranu bez toksina sa 0,2% ispitivanog preparata MR bili su skladne telesne građe, pravilno razvijenog koštanog i mišićnog tkiva, živahnog temperamenta i dobre kondicije. Perje, koža i vidljive sluznice bile su bez osobenosti. Appetit je bio dobar, a feces uobičajeno formiran. Sposobnost aktivnog kretanja i koordinacija pokreta bili su usklađeni, a mišićni tonus bez osobenosti.

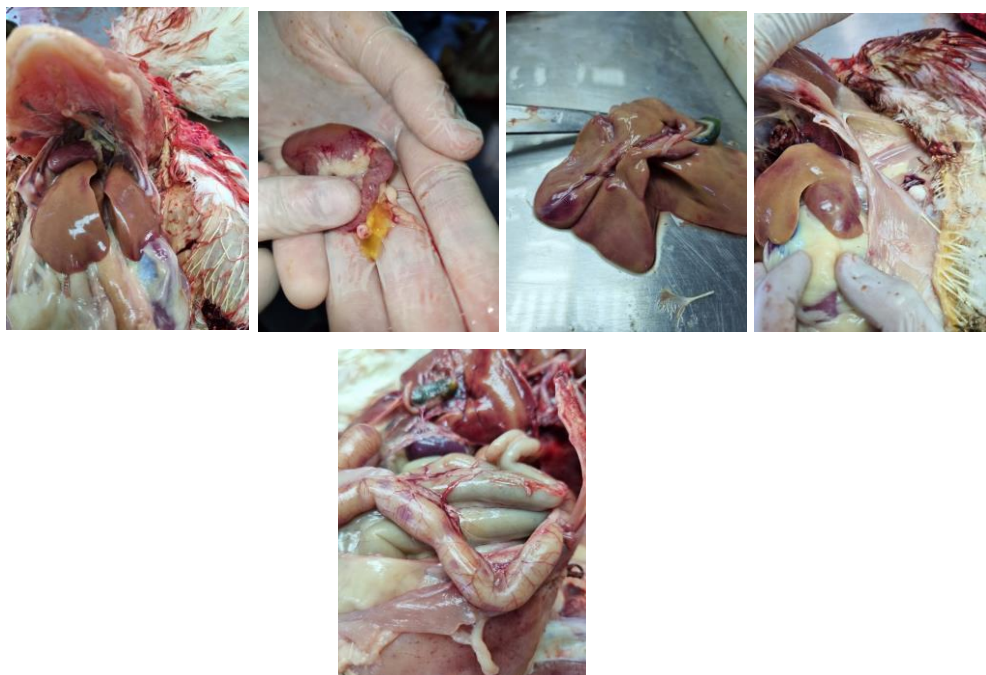
Kod oglednih grupa nisu uočeni izraženi klinički znaci poremećaja zdravstvenog stanja. Potrebno je naglasiti da su grupe koje su konzumirale kontaminiranu hranu, počev od druge nedelje oglada, uzimale povećane količine vode u odnosu na kontrolnu grupu. Kod manjeg broja jedinki primećen je sporadičan proliv.

## **5.2.3. Makroskopske i HP ispitivanja u tkivima brojlera**

### **5.2.3.1. Makroskopske promene u tkivima brojlera**

Kod brojlera E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane na obdukciji je zapažena pojava žute jetre trošne konzistencije i to kod 4/12 životinja, kod 2/12 životinja u duodenumu zapažena su sitna jedva vidljiva krvarenja. Kod brojlera E-II grupe primećene su diskretne diskoloracije na jetri kod 3/12 ispitivanih životinja. Kod brojlera E-III i E-IV grupe zapažena je pojava uvećane jetre sa žutom prebojenošću kod 4/12 odnosno 3/12 ispitivanih brojlera, kao i diskoloracije na srcu kod 1/12 ispitivanih životinja. Kod 4/12 brojlera E-V grupe primećena je žuta prebojenost jetre i kod jedne životinje primećene su promene u vidu žućkastih naslaga na jeziku. Žuta prebojenost jetre koja je bila trošne konzistencije primećena je kod 2/12 životinja. Kod brojlera kontrolne grupe i MR grupe na obdukciji nisu uočene makroskopske promene.

Histopatološke promene su primećene u svim tkivima tretiranih brojlera koje su hranjeni hranom kontaminiranom mikotoksinima sa ili bez ispitivanog preparata za detoksikaciju mikotoksina MR.



**Slika 11. Makroskopske promene u tkivima brojlera**

- a) Uvećana jetra sa žutom prebojenošću E-III i E-IV;**
- b) Diskoloracija na srcu E-III i E-IV; c) Žuta jetra trošne konzistencije E-I i E-V**
- d) Diskoloracija na jetri E-II; e) Sitna krvavljenja u crevima E-I**

#### **5.2.3.2. HP u duodenumu ispitivanih brojlera**

Kod brojlera K grupe kao i grupe brojlera koji su hranom dobijali samo ispitivani preparat MR u duodenumu nisu detektovane HP promene.

Kod brojlera E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/AfB<sub>1</sub>/kg hrane u duodenumu su zabeležene promene u vidu, hiperemije i hemoragije kao i atrofija crevnih resica uz umnožavanja peharastih ćelija, kao i kariopiknoze u Liberkinijevim kriptama.

Kod brojlera grupe E-II koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,2% ispitivanog preparata MR u duodenumu se zapažaju hiperemije, hemoragije i umnožavanje peharastih ćelija crevnih resica. Hemoragijske promene u duodenuma bile su detektovane samo kod 16,66% dok je umnožavanje peharastih ćelija detektovano kod 33,3% ispitivanih životinja. Kariopiknoza u Liberkinijevim kriptama nije bila zabeležena kod brojlera ove grupe. Možemo pretpostaviti da je manja zastupljenost i intenzitet HP promena brojlera ove grupe u odnosu na E-I grupu brojlera posledica protektivnog dejstva ispitivanog preparata za detoksikaciju mikotoksina MR.

Kod brojlera E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg hrane T-2 toksina HP pregledom zapažene su promene u duodenumu brojlera u vidu hiperemija, hemoragija i atrofija ćelija mukoze.

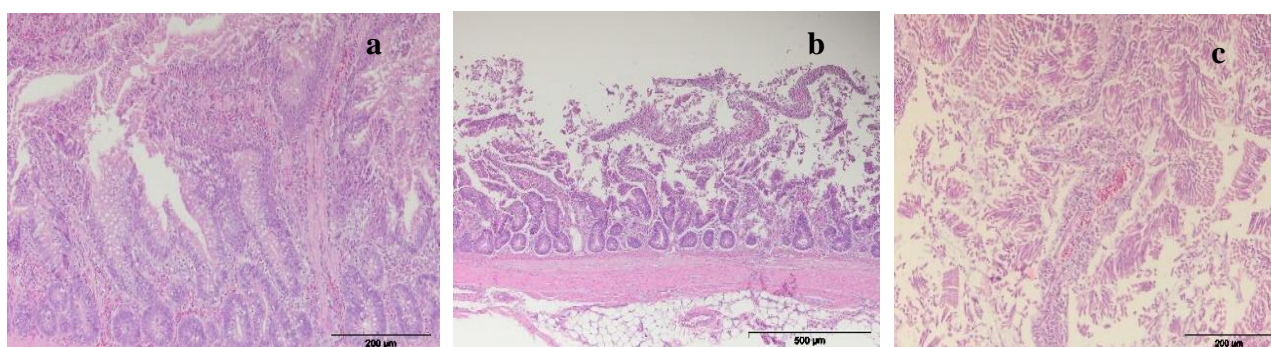
Kod brojlera E-IV grupe koji su hranom osim T-2 toksina dobijali i 0,2% ispitivanog preparata MR, hiperemija u duodenumu zabeležena je kod 41,6% a atrofija crevnih resica kod 33,3 % ispitivanih životinja u odnosu na brojlere E-III grupu. Ostale promene u crevima bile su slično zastupljene kod obe ogledne grupe.

U duodenumu brojlera E-V grupe zapažene su sledeće promene: hiperemije, hemoragije, i atrofija mukoze crevnih resica, umnožavanje peharastih ćelija kao i kariopiknoza u ćelijama Liberkinijevih kripti. Kod brojlera E-VI grupe koji su hranom pored AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina dobijali i ispitivani preparat MR zabeležene su iste promene, s tim što su detektovane kod manjeg broja životinja. Međutim te promene nisu bile izražene kao kod prethodnih grupa koje su uz toksine dobijale i preparat. Razlog je verovatno sinergistički efekat dva toksina AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina i konzumiranja manje količine kontaminirane hrane.

Broj HP promena u duodenumu po grupama ispitivanih životinja dat je u tabeli 15.

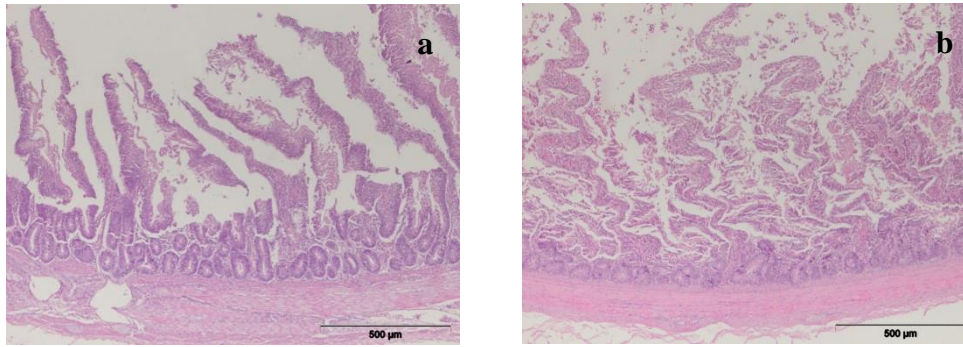
**Tabela 15. HP promene u duodenumu ispitivanih brojlera**

<b>PH promene</b>	<b>E-I</b>	<b>E-II</b>	<b>E-III</b>	<b>E-IV</b>	<b>E-V</b>	<b>E-VI</b>
Hiperemija	6/12	2/12	11/12	5/12	6/11	2/12
Hemoragija	7/12	2/12	3/12	2/12	5/11	1/12
Destrukcija mukoze/atrofija crevnih resica	12/12	9/12	8/12	4/12	9/11	3/12
Umnožavanje peharastih ćelija	10/12	4/12	3/12	0/12	6/11	4/12
Kariopiknoza Liberkinijevih kripti	8/12	0/12	8/12	2/12	8/11	1/12



**Slika 12. HP promene u duodenumu brojlera, HE bojenje**

- a) Hemoragija grupa E-I; b) Destrukcija crevnih resica i hiperemija grupa E-II;  
c) Hiperemija i deskvamacija E-III



**Slika 13. Atrofija crevnih resica kombinacijom AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina, HE bojenje**

**a) grupa E-V b) grupa E-VI (sa MR)**

### 5.2.3.3. HP promene u jetri ispitivanih brojlera

U hepatocitima brojlera E-I grupe koja je hranom dobijala 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> zapažene su promene u vidu mutnog bubrenja, vakuolarne degeneracije i nekroze, takođe, je u žučnim kanalima detektovan deskvamativni holangitis i periholangitis dok je u intersticijumu jetre zabeležena periportalna fibroza.

U hepatocitima brojlera E-II grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% ispitivanog preparata MR zapažene su promene u vidu mutnog bubrenja, vakuolarne degeneracije i nekroze, takođe je u žučnim kanalima zapažen deskvamativni holangitis i periholangitis. Mutno bubrenje detektovano je kod 16,66% a vakuolarna degeneracija hepatocita kod 50% ispitivanih životinja u odnosu na brojlere E-I grupe. Ostale promene u hepatocitima i žučnim kanalima bile su skoro jednako zastupljene kod brojlera E-I i E-II grupe. Manja zastupljenost nekih HP promena detektovanih u jetri može se pripisati zaštitnom delovanju ispitivanog preparata MR.

Kod brojlera E-III ogleadne grupe u hepatocitima žrtvovanih životinja zabeleženo je mutno bubrenje, vakuolarna degeneracija, hidropsna degeneracija i nekroza. Epitel žučnih kanalića bio je zahvaćen promenama kao što su hipertrofija, deskvamatorni holangitis i periholangitis. U intersticijumu jetre detektovana je periportalna fibroza i infiltracija eozinofilnih ćelija kao i vaskularna degeneracija krvnih sudova u jetri.

Kod brojlera E-IV grupe koji su uz T-2 toksin dobijali i ispitivani preparat MR HP promene u jetri bile su zastupljene kod manjeg broja životinja a neke od njih (mutno bubrenje i periportalna fibroza) nisu bile detektovane kod brojlera ove grupe. Hidropsna degeneracija hepatocita (8,3%), nekroza (33,3%), deskvamativni holangitis (33,3%) i intersticijalna infiltracija mononuklearnim ćelijama (50%) bile su zastupljene kod manjeg broja životinja u odnosu na brojlere E-III grupe. Vaskularna degeneracija krvnih sudova jetre detektovana je kod samo jedne jedinice ove grupe. Smanjena zastupljenost HP ili njihov



izostanak u jetri brojlera E-IV grupe može da ukaže na efikasnost dodatog preparata za detoksikaciju mikotoksina MR.

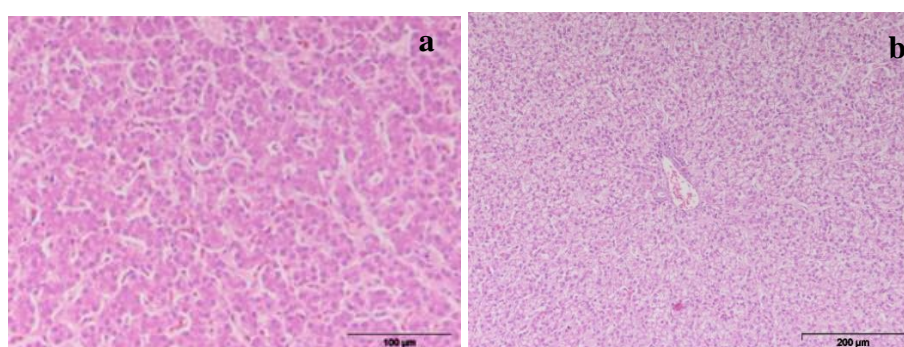
Kod brojlera E-V grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina u jetri, žučnim kanalima i intersticijumu detektovane su brojne promene u vidu mutnog bubrenja, vakuolarne degeneracije i nekroze, hiperplazije žučnih kanala, deskvamativnog holangitisa, periholangitisa, intersticijalne periportalne fibroze i infiltracije mononuklearnih ćelija u intersticijumu.

U hepatocitima brojlera E-VI grupe koji su hranom dobijali 0,1mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak 0,2% ispitivanog preparata MR zapažene su promene u vidu mutnog bubrenja, vakuolarne degeneracije i nekroze, takođe je u žučnim kanalima zapažen deskvamativni holangitis i periholangitis. Mutno bubrenje detektovano je kod 41,66% a vakuolarna degeneracija hepatocita samo kod jedne jedinke u odnosu na brojlere E-V grupe. Ostale promene u hepatocitima i žučnim kanalima bile su skoro jednako zastupljene kod brojlera E-V i E-VI grupe. Manja zastupljenost nekih patohistoloških promena detektovanih u jetri ove grupa brojlera može se pripisati zaštitnom delovanju ispitivanog preparata za detoksikaciju mikotoksina MR.

Broj HP promena u jetri po grupama ispitivanih životinja dat je u tabeli 16.

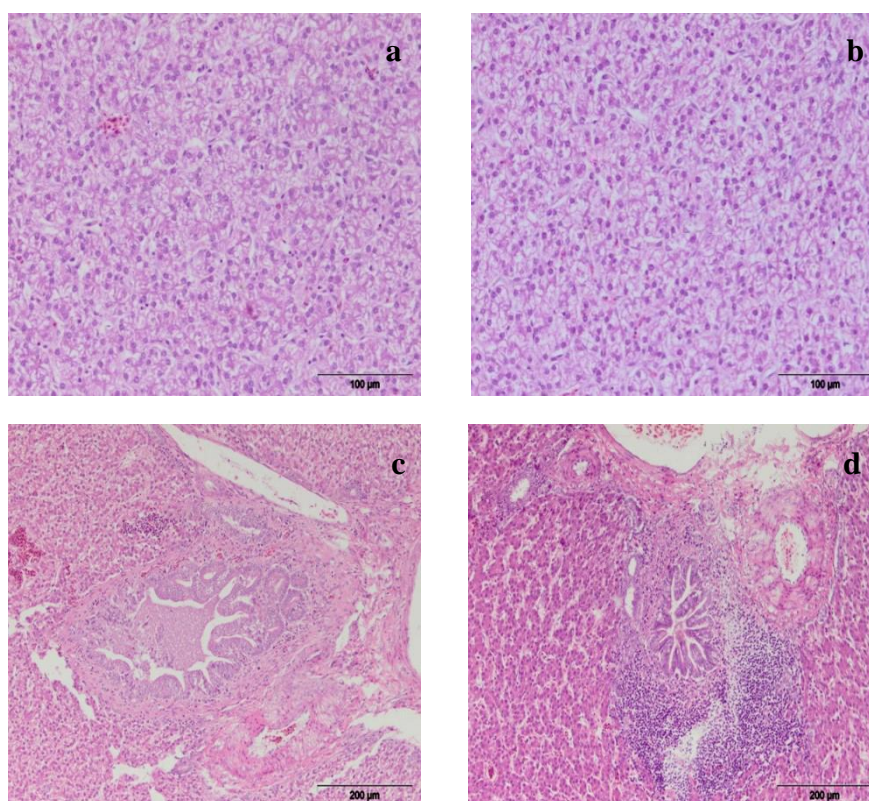
**Tabela 16. HP promene u jetri ispitivanih brojlera**

PH promene		E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI
<b>Hepatociti</b>	Mutno bubrenje	5/12	2/12	10/12	6/12	7/11	5/12
	Vakuolarna degeneracija	9/12	6/12	5/12	4/12	7/11	1/12
	Hidropsna degeneracija	8/12	1/12	6/12	1/12	0/11	0/12
	Nekroza	3/12	2/12	7/12	4/12	2/11	2/12
<b>Žučni kanali</b>	Hiperplazija žučnih kanala	6/12	4/12	6/12	2/12	7/11	4/12
	Deskvamativni holangitis	8/12	7/12	7/12	4/12	9/11	5/12
	Periholangitis	3/12	3/12	2/12	6/12	6/11	4/12
<b>Intersticijum</b>	Periportalna fibroza	3/12	1/12	1/12	0/12	2/11	0/12



**Slika 14. HP u jetri brojlera HE bojenje**

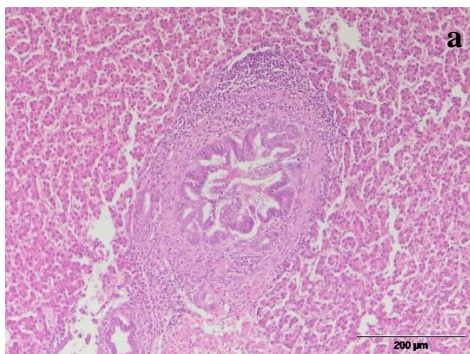
a) mutno bubrenje grupa E-I b) vakuolarna degeneracija E-II



**Slika 15. HP promene u jetri brojlera hranjenih hranom sa kombinacijom AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina**

**a) grupa E-III hidropsna degeneracija b) grupa E-IV hidropsna degeneracija**

**c) E-III holangitis g) grupa E-IV holangitis i periholangitis**



**Slika 16. HP promene u jetri brojlera, HE bojenje**

**a) grupa E-VI deskvamativni holangitis i mononuklearni periholangitis**

#### **5.2.3.4. HP promene u srcu ispitivanih brojlera**

U ćelijama srčanog mišića brojlera E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> zapažene su degeneracija, infiltracija kardiomiocita mononuklearnim ćelijama i hemoragije.

Kod brojlera E-II grupe koja je uz AfB<sub>1</sub> dobijala i ispitivani preparat MR degeneracija kardiomiocita bila je zabeležena samo kod 50% ispitivanih životinja u odnosu na brojlere E-I grupe, dok su ostale promene bile slične učestalosti u odnosu na brojlere E-I grupe.

Kod brojlera E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina u kardiomiocitima opisane su sledeće promene: degeneracija, infiltracija mononuklearnih ćelija i krvavljenja u intersticijumu miokarda.

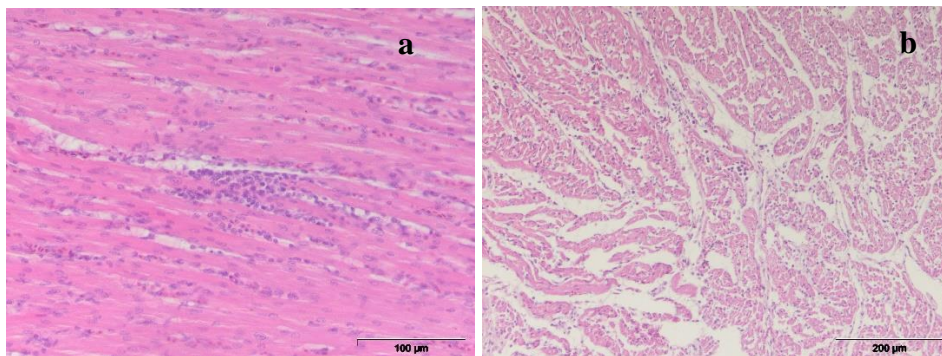
Kod brojlera E-IV grupe koji su uz T-2 toksin dobijale i 0,2% MR preparata promene u srčanom mišiću bile su zastupljene kod manjeg broja životinja u odnosu na brojlere E-III grupe, i to intersticijalna infiltracija mononuklearnih ćelija kod (25%), a krvavljenja u intersticijumu miokarda kod (50%) ispitivanih životinja ove grupe.

Kod brojlera E-V grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5mg/kg T-2 toksina u kardiomiocitima opisane su sledeće promene: degeneracija, infiltracija mononuklearnih ćelija i krvavljenja u intersticijumu miokarda.

Kod brojlera E-VI grupe koji su hranom pored AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina dobijali i ispitivani preparat MR HP promene u srčanom mišiću bile su zastupljene kod manjeg broja ispitivanih životinja u odnosu na brojlere E-V grupe, i to intersticijalna infiltracija mononuklearnih ćelija kod (25%) a krvavljenja u intersticijumu miokarda kod (30%) brojlera ove grupe.

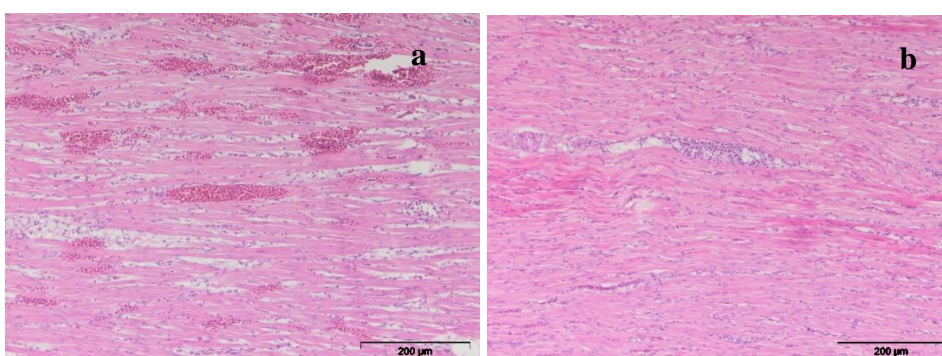
**Tabela 17. HP promene u srcu ispitivanih brojlera**

<b>PH promene</b>		<b>E-I</b>	<b>E-II</b>	<b>E-III</b>	<b>E-IV</b>	<b>E-V</b>	<b>E-VI</b>
<b>Miokardiociti</b>	Degeneracija	11/12	6/12	9/12	8/12	10/11	9/12
	Infiltracija mononuklearnih ćelija	4/12	3/12	9/12	3/12	5/11	2/12
<b>Intersticijum</b>	Hemoragije	6/12	6/12	8/12	6/12	4/11	3/12



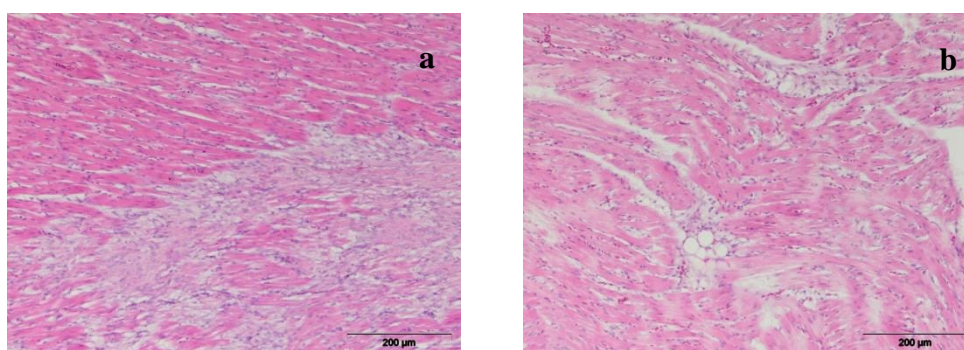
**Slika 17. HP promene u srcu brojlera, HE bojenje**

**a) E-I, mononuklearni miokarditis b) E-II, mononuklearni infiltrat**



**Slika 18. HP promene u srcu brojlera, HE bojenje**

**a) E-III, hiperemija i hemoragija b) E-IV, infiltracija mononuklearnih ćelija**



**Slika 19. Degeneracija miokarda srca, HE bojenje**

**a) grupa E-V; b) grupa E-VI;**

#### **5.2.3.5. HP promene u BF ispitivanih brojlera**

Kod brojlera E-I ogleadne grupe koja je hranom dobijala 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> u ćelijama limfnih folikula BF zapažene su hemoragije, nekroza i apoptoza.

Ove promene zabeležene su i kod brojlera E-II ogledne grupe koja je uz 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> dobijala i ispitivani preparat MR. Nekrotične promene u limfnim folikulima BF zabeležene su samo kod 8,3% ispitivanih životinja u odnosu na E-I grupu.

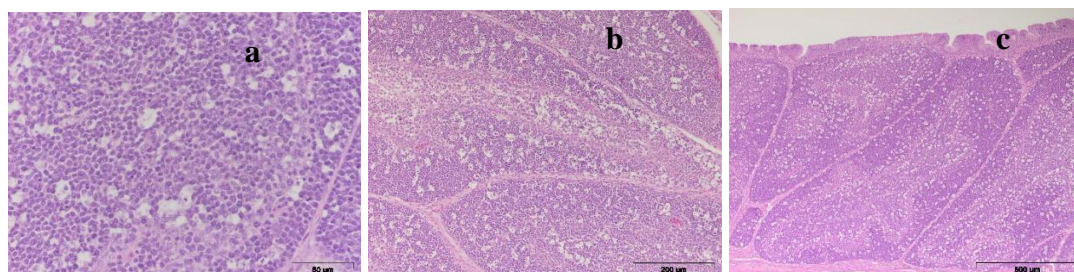
U limfnim folikulima BF kod brojlera E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina opisane su promene u vidu nekroze i apoptoze. Nekrotične promene u ćelijama BF kod brojlera E-III grupe zabeležene su kod 100% životinja.

Brojlera E-IV grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak ispitivanog preparata MR nekroza u ćelijama BF opisana je kod 50% ispitivanih životinja.

Kod brojlera E-V ogledne grupe koja je hranom dobijala 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina u ćelijama limfnih folikula BF zapažene su nekroza i apoptoza. Iste promene zabeležene su i kod brojlera E-VI ogledne grupe koja je hranom dobijala 0,1 mg/kg i 0,5 mg/kg T-2 toksina uz dodatak ispitivanog MR preparata apoptoza u ćelijama BF opisana je kod 50% ispitivanih životinja.

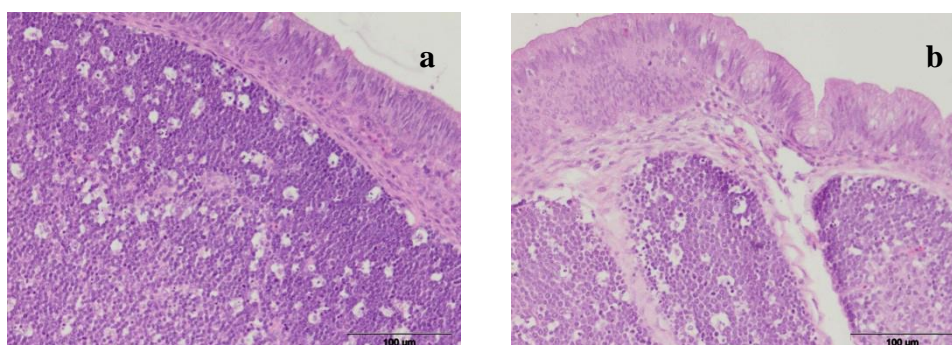
**Tabela 18. HP promene u BF ispitivanih brojlera**

	PH promene	E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI
<b>Limfni folikuli</b>	Nekroza	7/12	1/12	12/12	7/12	2/11	2/12
	Apoptoza	9/12	5/12	6/12	6/12	11/11	5/12



**Slika 20. HP promene u BF brojlera, HE bojenje**

**a) E-I, nekroza b) E-II, apoptoza c) E-III, nekroza**



**Slika 21. Apoptoza BF, HE bojenje a) grupa E-V; b) grupa E-VI**

#### 5.2.4 Prisustvo rezidua AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina i njihovih metabolita u grudnoj muskulaturi i jetri ispitivanih brojlera

Analiza prisustva AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina kao i njihovih metabolita (AfM<sub>1</sub>, HT-2 toksin, T-2 triol i T-2 tetraol) u tkivima brojlera (grudna muskulatura i jetra) urađena je tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom uz detektor (Agilent 6460c LC-MS/MS). Analitička metoda ispitivanja je razvijena i validirana u laboratoriji Patent Co. Limit kvantifikacije metode (LOQ) za AfB<sub>1</sub>, iznosi 0,1 µg/kg, za T-2 toksin iznosi 0,2 µg/kg. Izotopsko obeleženi interni standardi mikotoksina, koji su korišćeni u metodi, za korigovanje uticaja matriksa su bili (<sup>13</sup>C<sub>24</sub>) AfB<sub>1</sub> CRM Biopure™ (0,5 µg/mL) za određivanje aflatoksina i (<sup>13</sup>C<sub>24</sub>) T-2 toksina CRM Biopure™ (25 µg/mL) za određivanje T-2 toksina. Tačnost analitičke metode (Recovery, %) je > 75% za svaki ispitivani analit. Metoda određivanja je bila linearna u opsegu od 0,1 do 1,2 µg/kg za AfB<sub>1</sub> i AfM<sub>1</sub> i od 0,2 do 4,0 µg/kg za T-2 toksin.

U tabeli 19. dati su podaci koji pokazuju da su brojleri hranjeni sa 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane imali prosečnu koncentraciju AfB<sub>1</sub> u jetri od 0,235 µg/kg. Grupa brojlera (E-II) koja je uz 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane dobijala i 0,2% preparata MR imala je za 51,06% nižu koncentraciju AfB<sub>1</sub> u jetri (0,12 µg/kg) u odnosu na E-I grupu.

Kod brojlera E-V i E-VI grupe nisu detektovani ostaci AfB<sub>1</sub> u jetri i grudnoj muskulaturi. Pretpostavlja se da je razlog to što su obe ove grupe brojlera konzumirale niže količine kontaminirane hrane u odnosu na brojlere E-I i E-II grupe.

Kod brojlera E-III, E-IV, E-V i E-VI, grupe nisu detektovani ostaci T-2 toksina, HT-2 toksina kao i T-2 triola i T-2 tetraola u ispitivanim tkivima. Razlog je jako brzo metabolisanje T-2 toksina, već za 24h od unošenja u organizam.

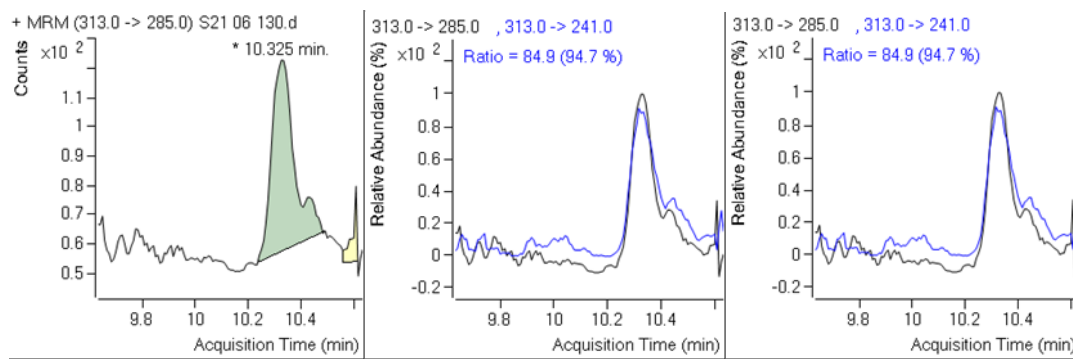
**Tabela 19. Koncentracije AfB<sub>1</sub> u ispitivanim tkivima brojlera u µg/kg**

Tkivo	E-I	E-II	E-V	E-VI
Jetra	0,235±0,07	0,12±0,02 <sup>aa</sup>	<LOD	<LOD
Mišić	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

LOD – limit detekcije

a - statistički značajna razlika u odnosu na E-I grupu (a=P<0,05 aa=P<0,01 aaa=P<0,001)





**Slika 22. LC-MS/MS Rezidue AfB<sub>1</sub> u jetri brojlera E-II grupe µg/kg**

AfM<sub>1</sub>, metabolit AfB<sub>1</sub> se stvara u jetri u procesu hidroksilacije pošto je rastvorljiv u vodi (kod mlečnih životinja se izlučuje putem mleka, a kod ostalih životinja putem urina). Kod životinja koje ne luče mleko može se kao metabolit naći u jetri i urinu.

AfM<sub>1</sub> nije detektovan u jetri ispitivanih brojlera.

Metaboliti T-2 toksina, HT-2, T-2 triol i T-2 tetraol nisu detektovani u jetri i grudnoj muskulaturi ispitivanih brojlera.

## 6. DISKUSIJA

Zbog bolje preglednosti diskusija je podeljena na potpoglavlja, prema postavljenom cilju i zadacima istraživanja. Na osnovu proizvodnih rezultata, rezultata makroskopskih i histopatoloških kao i ispitivanja prisustva rezidua u tkivima cilj je bio da se utvrdi u kom odnosu stoje navedeni parametri u zavisnosti od sadržaja AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina (pojedinačno ili u kombinaciji) u hrani i efektima preparata za detoksikaciju mikotoksina MR na ispitivane parametre.

### 6.1. Proizvodni rezultati

#### 6.1.1. Uticaj AfB<sub>1</sub> i preparata za detoksikaciju (MR) na proizvodne rezultate brojlera

Počevši od 7. dana pa do kraja ogleda brojleri E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane ostvarili su statistički značajno niže TM u odnosu na brojlere E-II grupe. Brojleri E-II grupe koji su hranom uz 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> dobijali i 0,2% preparata MR imali su 42. dana ogleda 12,5% više TM u odnosu na brojlere E-I grupe, što se može pripisati protektivnom uticaju ispitivanog preparata. Takođe, posmatrano za ceo ogled brojleri K i MR grupe imali su za 21,84 i 28,17% više TM u odnosu na brojlere E-I grupe. Iako je preparat delimično ublažio toksične efekte AfB<sub>1</sub> do kraja ogleda nije došlo do normalizacije TM brojlera E-II grupe. Tedesco i sar, 2004 i Dewegovda i sar. 2000, dobili su rezultate slične našim istraživanjima, koristeći doze AfB<sub>1</sub> od 0,8 i 0,3 mg/kg hrane. Posmatrano za period 35-42. dan brojleri E-II grupe koji su hranom uz 0,1 mg AfB<sub>1</sub> dobijali i 0,2% MR preparata, imali su za 14,21% više priraste u odnosu na brojlere E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AfB<sub>1</sub>. U odnosu na visinu prirasta u ovom periodu primećujemo mehanizme kompenzatornog rasta, no i pored toga to nije bilo dovoljno da se neutrališu negativni efekti AfB<sub>1</sub> na TM i prirast tokom celog perioda ogleda, što odgovara navodima Raju i Dewegovda (2000).

Zanimljivo je da su u periodu od 35-42. dana ogleda brojleri grupe MR imali za 9,37 % više priraste u odnosu brojlere E-I grupe. Taj podatak nam ukazuje da se preparat može koristiti i preventivno u tovu brojlera, što se može se pripisati i pozitivnom delovanju probiotskih kultura dodatih u preparat. Brojleri E-I grupe, u periodu od 35-42 dana konzumirali su za 7,16 % manje hrane u odnosu na brojlere E-II grupe, KK hrane je dobar pokazatelj uspešnosti i ekonomske opravdanosti tova. KK bio je niži kod brojlera kontrolnih grupa u odnosu na ogledne grupe. Brojleri E-I grupe ostvarili su najvišu konverziju tokom perioda tova 2,2 kg, dok su brojleri grupe koja je hranom uz AfB<sub>1</sub> dobijala i MR preparat ostvarili KK od 2,1 kg. Ovaj podatak ukazuje da su brojleri E-I grupe konzumirali dovoljnu količinu hrane ali su imali viši KK od brojlera E-II grupe, zbog nižih TM i

prirasta ostvarenih tokom oglada, a što se može pripisati toksičnim efektima AfB<sub>1</sub>. Slične rezultate našima dobili su u svom radu Tedesco i sar. (2004) i Raju i Dewgovda (2000) koristeći koncentracije AfB<sub>1</sub> od 0,3 i 0,8 mg/kg hrane, kao i preparate za detoksikaciju mikotoksina na bazi zeolita.

Brojleri E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane ostvarili su statistički značajno niže TM tokom celog oglada (1-42. dan) u odnosu na brojler E-IV, K i MR grupe i to za 11,01, 21,75 i 28,09%. Slični rezultati su i za prirast. Brojleri E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina po kg hrane ostvarili su statistički značajno niže priraste tokom celog oglada u odnosu na brojler E-IV i K i MR grupe i to za 11,29, 21,73 i 28,07%. Naši rezultati saglasni su sa rezultatima Sing i sar 2020, koji su u svojoj studiji koristili doze T-2 toksina u rasponu od 0,05 do 0,2 mg/kg hrane. Naši rezultati u suprotnosti su sa rezultatima Raju i Dewgovda 2000 i Wei i sar. 2019, koji su koristili doze T-2 toksina u rasponu od 2-6 mg/kg hrane. Brojleri grupe E-III konzumirali su gledano za ceo ogled neznatno niže količine hrane u odnosu na brojlere E-IV, K i MR grupe. KK kod brojlera E-III grupe iznosio je 2,2 kg hrane za kg prirasta, kod brojlera E-IV grupe 2,1. Brojleri E-IV grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina uz dodatak 2kg/t ispitivanog preparata za detoksikaciju, ostvarili su KK od 2,1. a brojleri K i MR grupe ostvarili su KK od 1,8 odnosno 1,7 kg.

Praćeno za ceo ogled brojleri E-V koji su hranom dobijali 0,1mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina imali su najniže ostvarene TM u odnosu na brojlere ostalih grupa koji su hranom dobijali AfB<sub>1</sub>, T-2 toksin ili kombinaciju oba toksina.

Brojleri E-V grupe imali su za 7,34% i 7,44% niže TM u odnosu na brojlere E-I i E-III grupe koji su hranom dobijali pojedinačne doze AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina. Brojleri E-VI grupe koji su hranom uz kombinaciju AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju MR imali su za 2,88% više TM u odnosu na brojlere E-V koji su dobijali hranom kombinaciju dva mikotoksina. Posmatrajući priraste zbirno za ceo ogled 1-42. dana dokazano je da su brojleri E-I i E-III grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina imali za 14,67% i 14,77% više priraste u odnosu na brojlere E-V grupe koji su hranom dobijali kombinaciju ova dva mikotoksina. Brojleri E-VI grupe koji su hranom uz kombinaciju dva toksina dobijali i preparat za detoksikaciju MR imali su za 10,43% više priraste posmatrano za ceo ogled u odnosu na brojlere E-V grupe. Naši rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Stefanović i sar. 2023. Naši rezultati u suprotnosti su sa rezultatima Girish i Dewegowda 2006 god. Oni su u svom radu koristili više doze AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina te je i učinak dodvanih adsorbenata bio slabiji.

Brojleri E-V grupe koji su hranom dobijali AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin konzumirali su za 11,76 i 11,83 % manje hrane tokom celog oglada u odnosu na brojlere E-I i E-III grupe. Brojleri E-VI grupe koji su hranom uz kombinaciju AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina dobijali i preparat za detoksikaciju MR konzumirali su za 2,94% više hrane u odnosu na brojlere E-V grupe tokom celog oglada. Brojleri E-V i E-VI grupe ostvarili su niže KK 2,1 kg u odnosu na brojlere E-I i E-III koji su tokom celog perioda tova ostvarili

2,2 kg. Razlog je verovatno što su tokom celog perioda tova konzumirali manje količine hrane. Naši rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Stefanović i sar. 2023, što se može pripisati sinergističnom toksičnom efektu dva dodata mikotoksina u hranu brojlera.

## ***6.2. Histopatološka ispitivanja u duodenumu ispitivanih brojlera***

AfB<sub>1</sub> u organizam životinja najčešće dospeva nakon unošenja kontaminirane hrane. Resorpcija sa sluznice duodenuma počinje 30 minuta nakon unošenja u organizam. Zato je logično da su histopatološke promene i zabeležene u digestivnom traktu brojlera. Kod brojlera E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/ AfB<sub>1</sub> /kg hrane u duodenumu su zabeležene promene u vidu, hiperemije kod 50%, hemoragija kod 58,33%, destrukcija enterocita i atrofija crevnih resica kod 100%, umnožavanja peharastih ćelija kod 83,33% kao i kariopiknoze u Liberkinijevim kriptama kod 66,6% eksperimentalnih životinja. AfB<sub>1</sub> dovodi do promene permeabiliteta crevnog epitela uticajem na proteine transmembranskog kompleksa kao što su okludin, klaudin i intercelularni strukturni proteini zone okludens 1,2 i 3. AfB<sub>1</sub> može da prekine integritet mehaničke barijere crevne sluzi, uticajem na broj peharastih ćelija. Usled povećane propustljivosti sluznice može doći do delovanja patogenih mikroorganizama i pojave zapaljenja. Takođe, se zna da i niske doze AfB<sub>1</sub>, mogu indukovati infiltraciju sluznice tankih creva mononuklearnim ćelijama kod brojlera (Sarker i sar., 2023) što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Kod brojlera E-II grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AfB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% preparata za detoksikaciju MR navedene histopatološke promene detektovane su kod manjeg broja životinja. Hiperemija crevne sluznice kod 16,63%, hemoragije kod 16,6% destrukcija enterocita i atrofija resica kod 75%, umnožavanje peharastih ćelija kod 33,3% dok kariopiknoza ćelija Liberkinijevih kripti nije zabeležena kod životinja ove grupe. Redukovanje prisustva PH promena može se pripisati delimičnom protektivnom efektu MR preparata. Ipak destrukcija mukoze i atrofija crevnih resica prisutna je i dalje kod velikog broja životinja E-II grupe. Ovo je jedan od razloga što su životinje ove ogleadne grupe ostvarile takođe slabe proizvodne rezultate, iako je preparat MR delimično ublažio štetne efekte AfB<sub>1</sub>. Naši rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Poloni i sar. 2015 i Lakkawar i sar. 2017. god.

Kod brojlera E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane, detektovane se u duodenumu slične histopatološke promene kao i kod brojlera koji su hranom dobijali samo AfB<sub>1</sub>. Hiperemija kod 91,66%, hemoragije kod 25% destrukcija enterocita i atrofija resica kod 66,6%, umnožavanje peharstih ćelija kod 25% dok je kariopiknoza ćelija Liberkinijevih kripti detektovana kod 66,6% životinja ove grupe. Citotoksičnost je jedna od štetnih osobina molekula T-2 toksina,

Većina autora smatra da T-2 toksin inaktiviše ključni enzim transkripcije, peptidil transferazu. Takođe, meta T-2 toksina je i 60S subjedinica ribozoma i sprečavanje inicijacije polipeptidnog lanca. Ujedno cilj su sve ćelije koje se brzo razmnožavaju, uključujući i ćelije gastrointestinalnog trakta (Janik i sar. 2021., Rai i sar. 2011 i Adhikari i sar 2017).

Grupa E-IV koja je hranom uz 0,5 mg/kg T-2 toksina dobijala i 0,2% preparata za detoksikaciju mikotoksina imala je promene slabijeg intenziteta koje su se javile kod manjeg broja životinja u odnosu na E-III grupu. I to hiperemija kod 41,66%, hemoragije kod 16,6% destrukcija enterocita i atrofija resica kod 33,3%, dok je kariopiknoza ćelija Liberkinijevih kripti zabeležena kod 16,6% životinja ove ogledne grupe. To može da se pripíše protektivnom dejstvu preparata za detoksikaciju MR. Naši rezultati u saglasnosti su sa nalazima (Sokolović i sar. 2007 i Nešić i sar. 2007). Ono što je zanimljivo da prokomentarišemo na ovom mestu da se ni kod jedne grupe životinja koje su hranom dobijale 0,5 mg/kg T-2 toksina, nisu javile nekrotične lezije u ustima, niti na prstima kao ni nekrotični gastroenteritis. Većina autora smatra da se ovakve promene javljaju samo pri unošenja doza većih od 1mg T-2 toksina po kg/hrane, Janik i sar. 2021, Sokolović i sar. 2007).

Kod brojlera E-V grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane. Histopatološke promene u vidu hiperemije viđene su kod 54,5%, hemoragije kod 45,4%, destrukcija enterocita i atrofija resica kod 81,81%, umnožavanje peharastih ćelija kod 54,5% i kariopiknoza ćelija Liberkinijevih kripti kod 72,72% ispitivanih životinja. Histopatološke promene nastale su napred opisanim mehanizmima. Iako se možda očekivalo da intenzitet i broj promena bude veći zbog sinergističkog dejstva oba toksina, to se nije dogodilo jer su životinje ove grupe konzumirale približno 12% manje hrane posmatrano za ceo ogled, od brojlera E-I i E-III grupe. Čime su posledično unosile manje AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina. Naši rezultati u saglasnosti su sa radovima Stefanović i sar. 2023. Kod brojlera E-VI grupe koje su hranom uz AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin dobijali i preparat za detoksikaciju MR, zabeležene su histopatološke promene kod manjeg broja životinja u odnosu na E-V grupu. Hiperemije su viđene kod 16,66%, hemoragije kod 8,33%, destrukcija enterocita i atrofija resica kod 25%, umnožavanje peharastih ćelija kod 33,33% i kariopiknoza ćelija Liberkinijevih kripti kod 8,33% ispitivanih životinja. Smatra se da su ovi rezultati nastali sa jedne strane zbog konzumiranja značajno manje količine hrane i posledično unošenja manje toksina a sa druge strane rezultat su protektivnog delovanja preparata za detoksikaciju MR.

### ***6.3. Histopatološke promene u jetri ispitivanih brojlera***

AfB<sub>1</sub> je visoko rastvorljivo jedinjenja koje se lako se resorbuje sa mesta izloženosti, najčešće je to gastrointestinalni trakt. Nakon ulaska u organizam, AfB<sub>1</sub> se transportuju kroz ćelijske membrane

odakle dospeva u cirkulaciju. U krvi se distribuiraju u različita tkiva a pre svega u jetru koja je glavni organ metabolizma ovog ksenobiotika. AFB<sub>1</sub> se uglavnom metabolišu u jetri u reaktivni epoksidni intermedijer ili se hidroksilišu u manje toksičan AfM<sub>1</sub>. Različiti izoformi enzima CIP-450 aktiviraju se u jetri i oni metabolišu AFB<sub>1</sub> u reaktivne vrste kiseonika (aflatoksin-8,9-epoksid), koji zatim može da se veže za proteine i izazove akutnu aflatoksikozu ili se reaktivni AFB<sub>1</sub>-8-9-epoksid alkilira i formira N7 guaninske adukte, DNK te tako ispoljava karcinogeni efekat. S obzirom da je primarno mesto metabolisanja AFB<sub>1</sub> jetra logično je da se histopatološke promene javljaju u jetri, Diaz i Murcia 2011. AFB<sub>1</sub> može da utiče na aktivnost antioksidativnih enzima i antimflamatornih citokina, pojačava lipidnu peroksidaciju, aktivnost proinflamatornih citokina i apoptozu hepatocita (Fouad i sar. 2019).

U jetri ispitivanih brojlera promene su detektovane na tri nivoa i to u hepatocitima u vidu (mutnog bubrenja, vakuolarne degeneracije, hidropsne degeneracije i nekroze). U žučnim kanalima u vidu (hiperplazije žučnih kanala, deskvativnog holangitis i periholangitisa) i periportalne fibroze. Mutno bubrenje, vakuolarna degeneracije i hidropsna degeneracija predstavljaju promene nastale usled oštećenja integriteta ćelijske membrana, a nekroza, pucanje i smrt hepatocita usled ruptore plazma membrane, kariolize i oslobađanje ćelijskog sadržaja usled delovanja reaktivnih kiseoničnih vrsta, Ali i sar. 2021.

Kod brojlera E-I grupe, zabeležene su histopatološke promene u hepatocitima u vidu mutnog bubrenja kod 41,66%, vakuolarne degeneracije kod 75% hidropsne degeneracije kod 66,66% i nekroza kod 25% ispitivanih životinja. Takođe su zabeležene i promene u vidu hiperplazije žučnih kanalića i to kod 50%, deskvativni holangitis kod 66,66%, periholangitis kod 25% kao i periportalna fibroza kod 25% ispitivanih životinja. Kod brojlera E-II grupe koji su hranom dobijali 0,1mg AFB<sub>1</sub> uz dodatak 0,2% preparata za detoksikaciju, promene su bile vidljive kod manjeg broja životinja, ali nisu u potpunosti nestale, što ukazuje da je preparat MR ostvario delimičan protektivni efekat. Kod brojlera E-II grupe zabeležene su histopatološke promene u hepatocitima u vidu mutnog bubrenja kod 16,66%, vakuolarne degeneracije kod 50% hidropsne degeneracije kod 8,33% i nekroza kod 16,66% ispitivanih životinja. Takođe, su zabeležene i promene u vidu hiperplazije žučnih kanalića i to kod 33,33%, deskvativni holangitis kod 58,33%, periholangitis kod 25% kao i periportalna fibroza kod 8,33% ispitivanih životinja. Naši rezultati u saglasnosti su sa nalazima (Ślizewskai sar. 2019; Tessari i sar. 2006. Denli i Okan 2006).

Mikotoksini iz grupe trihotecena se vezuju za ribosome, remeteći time sintezu molekula DNK i proteina (Pestka, 2007). T-2 toksin izaziva inhibiciju sinteze eukariotskih proteina, inhibiciju ćelijske deobe i sinteze RNK/DNK, inhibiciju aktivacije signalnih puteva protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK), promenu integriteta membrane, poremećaj funkcije mitohondrija, indukciju ekspresije gena citokina i ćelijsku smrt (Rocha i sar. 2005, Wu, Dohnal i sar. 2013).

Citotoksični efekat T-2 toksin, koji se manifestuje apoptozom ćelija, ostvaruje stvaranjem slobodnih radikala, i to prevashodno peroksidnih, hidroksilnih radikala kao i superoksidnih molekula, što dovodi do peroksidacije viših nezasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani i njenog oštećenja (Lobo i sar., 2010).

Zbog toga što kao i kod većine drugih mikotoksina metabolisanje počinje u jetri, toksični efekti viđeni su u vidu histopatoloških promena u jetri. Kod brojlera E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane detektovane su histopatološke promene u vidu mutnog bubrenja kod 83,33%, vakuolarne degeneracije kod 41,66% hidropsne degeneracije kod 50% i nekroze kod 58,33% ispitivanih životinja. Takođe, su zabeležene i promene u vidu hiperplazije žučnih kanalića i to kod 50%, deskvamativni holangitis kod 66,6%, periholangitis kod 16,66% kao i periportalna fibroza kod 8,33% ispitivanih životinja. Brojleri ove grupe imali su najveći broj životinja sa izraženim nekrotičnim promenama. Kod brojlera E-IV grupe koje su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane promene su bile viđene kod manjeg broja životinja u odnosu na brojlere E-III grupe. Kod brojlera E-IV grupe zabeležene su histopatološke promene u hepatocitima u vidu mutnog bubrenja kod 50%, vakuolarne degeneracije kod 33,33% hidropsne degeneracije kod 8,33% i nekroza kod 33,33% ispitivanih životinja. Takođe, su zabeležene i promene u vidu hiperplazije žučnih kanalića i to kod 16,66%, deskvamativni holangitis kod 33,33% i periholangitis kod 50% ispitivanih životinja dok periportalna fibroza nije zabeležena kod brojlera ove grupe. Naši rezultati su u saglasnosti sa nalazima Grabarević i sar. 1992 i Fazekas i sar. 2000, koji su koristili iste doze T-2 toksina i dobili kod oglednih životinja slične histopatološke promene kao u našim istraživanjima. Kod brojlera E-V grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg T-2 toksina detektovane su histopatološke promene u vidu mutnog bubrenja kod 63,63%, vakuolarne degeneracije kod 63,63% i nekroze kod 18,18% ispitivanih životinja. Takođe, su zabeležene i promene u vidu hiperplazije žučnih kanalića i to kod 63,63%, deskvamativni holangitis kod 81,81%, periholangitis kod 54,54% kao i periportalna fibroza kod 18,18%. Kod brojlera E-VI grupe koji su hranom uz kombinaciju AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina dobijale i 0,2% preparata za detoksikaciju MR zabeležene su histopatološke promene, u vidu mutnog bubrenja kod 41,66%, vakuolarne degeneracije kod 8,33% i nekroze kod 16,66% ispitivanih životinja. Takođe, su zabeležene i promene u vidu hiperplazije žučnih kanalića i to kod 33,33%, deskvamativni holangitis kod 41,66% i periholangitis kod 33,33% ispitivanih životinja. Preparat za detoksikaciju MR delimično je ublažio štetne efekte AfB<sub>1</sub> i T-2 toksina, ali nije došlo do potpunog iščezavanja histopatoloških promena. Naši rezultati u saglasnosti su sa nalazima (Stefanović i sar. 2023).

#### ***6.4. Patohistološke promene u srcu ispitivanih brojlera***

Tačan mehanizam kardiotoksičnosti AFB<sub>1</sub> još nije sasvim jasan. Uneti AFB<sub>1</sub> može da indukuje porast koncentracije azot oksida (NO), tumor nekrozis faktora (TNF) i interleukina 1 (IL1). Visok nivo NO može da dovede do apoptoze u kardiomicitima. Visok nivo NO može da kompromituje stvaranje ATP u mitohondrijama kardiomiocita. Gubitak energije u kardiomiocitima može da dovede do nekroze. TNF i IL-1 mogu da dovedu do apoptoze u kardiomicitima (Wang i sar. 2017).

Kod brojlera E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg hrane histopatološkim pregledom ustanovljene su promene u srcu u vidu degeneracije miokardiocita kod 91,66%, infiltracije mononuklearnim ćelijama kod 33,33% i hemoragije kod 50% ispitanih životinja, Kod brojlera E-II grupe koji su hranom uz 0,1 mg AFB<sub>1</sub> dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju MR histopatološke promene viđene su kod manjeg broja životinja i to degeneracije kardiomiocita kod 50%, infiltracija mononuklearnim ćelijama 33,33% dok su hemoragije bile zastupljene kod istog broja životinja 50%. Ovaj podatak nam govori da je preparat MR delimično ublažio štetne efekte AFB<sub>1</sub>. Naši rezultati saglasni su sa rezultatima (Stefanović i sar. 2023).

T-2 toksin može kod živine izazvati srčanu fibrozu i disfunkciju. Pod uticajem T-2 toksina mogu nastati reaktivne kiseonične vrste i peroksidni radikali koji dovode do oštećenja funkcija mitohondrija i posledičnih reakcija, (Dai i sar. 2022).

Kod brojlera E-III grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina po kg/hrane detektovane su promene u srcu u vidu degeneracije kardiomiocita kod 75% ispitivanih životinja, infiltracija mononuklearnim ćelijama u kardiomiocitima kod 75% i hemoragije u intersticijumu kod 66,6% ispitanih životinja. Brojleri E-IV grupe koji su hranom uz T-2 toksin dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju MR imali su iste histopatološke promene u srcu samo kod manjeg broj životinja i to degeneracije kardiomiocita kod 66,66%, infiltracija mononuklearnim ćelijama 25% i hemoragije u intersticijumu kod 50% ispitanih životinja. Naši rezultati saglasni su rezultatima (Grabarevič i sar, 1992) koji su sa istom dozom T-2 toksina dobili slične rezultate.

Kod brojlera E-V grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AFB<sub>1</sub> i 0,5 mg T-2 toksina zabeležene su histopatološke promene u vidu degenerativnih promena u kardiomiocitima kod 83,33%, infiltracije kardiomiocita mononuklearnim ćelijama kod 45,45% i hemoragija u intersticijumu kod 36,36% ispitivanih životinja. Iako smo možda zbog kumulativnog toksičnog efekta oba toksina očekivali intenzivnije histopatološke promene do toga nije došlo jer su životinje E-V i E-VI grupa konzumirale oko 12% manje hrane u odnosu na brojlere E-I i E-III grupe koje su dobijale pojedinačno AFB<sub>1</sub> i T-2 toksin. Brojleri E-VI grupe koji su hranom uz AFB<sub>1</sub> i T-2 toksin dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju mikotoksina MR imali su neznatno bolje rezultate histopatoloških ispitivanja u odnosu na brojlere E-V grupe. Promene u vidu degenerativnih promena u kardiomiocitima detektovane su kod 75%, infiltracije kardiomiocita mononuklearnim ćelijama kod 16,66% i hemoragija u



intersticijumu kod 25% ispitivanih životinja. Naši rezultati saglasni su sa rezultatima (Stefanović i sar., 2023).

### **6.5. Histopatološke promene u BF kod ispitivanih brojlera**

Poznato je da AfB<sub>1</sub> ima izrazitu imunsku toksičnost, naročito izraženu u slezini i BF kod živine. AfB<sub>1</sub> dovodi do smanjenje relativne težine ovih organa. Redukuje „belu pulpu“ smanjujući količinu limfnog tkiva i limfocita. Naročito je osetljiva slezina a odmah iza nje i BF. AfB<sub>1</sub> može da smanji aktivnosti antioksidativnih enzima i poveća sadržaj malondialdehida (MDA) u slezini i BF. Posledično ove promene mogu da izazovu oksidativno oštećenje u vidu nekroze kao i povećanje apoptoze u ćelijama BF (Fouad i sar. 2019). Histopatološkim pregledom ustanovljene su promene u vidu nekroze i apoptoze u limfnim folikulima BF kod ispitivanih brojlera. Kod brojlera E-I grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> zapažene su promene u limfnim folikulima BF u vidu nekroza i to kod 58,33% i prisustvo apoptotičnih tela kod 75% ispitivanih životinja. Prisustvo preparata za detoksikaciju mikotoksina MR u hrani brojlera E-II grupe, koji su uz preparat dobijali i 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> značajno je redukovalo broj životinja sa nekrozom u limfnim folikulima 8,33% dok su apoptotična tela bila prisutna kod 41,66% ispitivanih životinja. Možemo zaključiti da je preparat delovao pozitivni na toksične efekte AfB<sub>1</sub> u hrani, no i pored toga nije mogao da u potpunosti eliminiše negativne efekte AfB<sub>1</sub>. Rezultati naših istraživanja u saglasnosti su sa nalazima Fouad i sar. 2020 i Espada i sar., 1992.

T-2 toksin sličnim mehanizmom dovodi do apoptoze ćelija BF. Na nivou molekularnog mehanizma, T-2 toksin je indukovao apoptozu posredovanu mitohondrijama, tako što je uticao na stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, promovišući translokaciju citohroma C između mitohondrija i citoplazme, i na taj način je dovodio do formiranja apoptotičnih tela (Yin i sar. 2020). Kod brojlera E-III i E-IV grupe koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane i 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane uz dodatak 0,2% preparata MR detektovane su nekroze i apoptotična tela u limfnim folikulima BF. Histopatološke promene u vidu nekroze detektovane su kod brojlera E-III grupe kod 100% a prisustvo apoptotičnih tela kod 50% ispitivanih životinja. Preparat za detoksikaciju mikotoksina MR smanjio je broj životinja sa nekrozom u limfnim folikulima na 50% dok je prisustvo apoptoze u limfnim folikulima brojlera E-IV grupe bilo isto kao i kod brojlera E-III grupe. Naši rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Konjević i sar., 2004, Nešić i sar., 2007. i Yin i sar., 2020).

Kod brojlera E-V grupe koji su hranom dobijali 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane i 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane nekrotične promene u limfnim folikulima bile su zastupljene kod 18,18%, a kod brojlera E-VI grupe kod 16,66% ispitivanih životinja. Gledajući za ceo ogled brojleri ove grupe su unosili oko 12% manje hrane u odnosu na brojlere grupa koji su dobijali pojedinačno AfB<sub>1</sub> i T-2 toksin. Promene u

vidu apoptotičnih tela u limfnim folikulima zabeležene su kod 100% životinja E-V grupe i kod 50% životinja E-VI grupe. Naši rezultati u saglasnosti su rezultatima (Stefanović i sar. 2023).

## **6.6 Prisustvo rezidua AfB<sub>1</sub>, T-2 toksina i njihovih metabolita u grudnoj muskulaturi i jetri ispitivanih životinja.**

Od načina unošenja AfB<sub>1</sub>, načina metabolisanja i hemijskih reakcija kojima biva podvrgnut u zavisice njegova sudbina u organizmu živine, kao i broj i vrsta metabolita koji mogu nastati u toku faze biotransformacije primarnog molekula, kao i faze eliminacije. Unos AfB<sub>1</sub> u organizam ljudi i životinja se najčešće dešava putem digestivnog trakta, respiratornog sistema i kože. Najznačajniji je peroralni način unošenja, pri čemu se resorpcija odvija u digestivnom traktu. AfB<sub>1</sub> se pojavljuje u krvotoku oko 30 minuta nakon peroralnog unosa, a u jetri posle jednog sata. Nakon resorpcije, AfB<sub>1</sub> se distribuira po organizmu krvotokom, i deponuju u sva meka tkiva i masne depoe. Najviše se nakupljaju u jetri, pogotovo pri dugotrajnom unosu, kao i u bubrezima. Nakupljanje u jetri i bubrezima je značajno, jer ovi organi predstavljaju mesta najizraženije biotransformacije (Leeson i sar., 1995).

U organizmu dolazi do niza biohemijskih reakcija i nastajanja veoma različitih produkata AfB<sub>1</sub>, u zavisnosti od metaboličkih puteva kojima molekul može biti podvrgnut. Jedan od najvažnijih metaboličkih puteva je epoksidacija. Veoma je bitno naglasiti da ključni karcinogeni efekti AfB<sub>1</sub> nastaju tokom metabolisanja (Swenson i sar., 1974) i nastanka AfB<sub>1</sub>-8-9-epoksida mehanizmom oksidacije 8,9-vinil etarske veze (Lizárraga-Paulín i sar., 2011).

Takođe, moguća je biotransformacija AfB<sub>1</sub> u polarne molekule AfM<sub>1</sub>, aflatoksin P<sub>1</sub> (AfP<sub>1</sub>) i aflatoksin Q<sub>1</sub> (AfQ<sub>1</sub>) za šta je odgovoran sistem mikrozomalnih monooksigenaza. Navedeni molekuli se usled svoje polarnosti eliminišu lakše putem urina i/ili mleka iz organizma (Monson i sar., 2015).

U procesu konjugacije nastaju metaboliti koji se mogu izlučivati putem žuči i ulaziti u enterohepatičnu recirkulaciju.

Brojleri hranjeni sa 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane imali prosečnu koncentraciju AfB<sub>1</sub> u jetri od 0,235 µg/kg. Grupa brojlera E-II koja je uz 0,1 mg AfB<sub>1</sub>/kg hrane dobijala i 0,2% preparata MR imala je za 51,06% nižu koncentraciju AfB<sub>1</sub> u jetri (0,12 µg/kg) u odnosu na E-I grupu.

Kod brojlera E-V i E-VI grupe nisu detektovani ostaci AfB<sub>1</sub> u jetri i grudnoj muskulaturi. Pretpostavlja se da je razlog to što su obe ove grupe brojlera konzumirale niže količine kontaminirane hrane u odnosu na brojlere E-I i E-II grupe. AfM<sub>1</sub> nije detektovan u jetri ispitivanih brojlera. Naši rezultati su u saglasnosti sa radovima (Stefanović i sar 2023, Monson i sar., 2015, Alam i sar. 2020).

Sa aspekta bezbednosti hrane za ljude ove informacije su nam veoma važne, jer su ljudi dvostruko izloženi uticaju AfB<sub>1</sub>. Sa jedne strane on u lanac ishrane ljudi ulazi preko zrnastih hraniva i namirnica poreklom od žitarica a sa druge strane preko namirnica animalnog porekla. Iako se radi o jedinjenjima u veoma niskim koncentracijama, poslednja klasifikacija (IARC, 2012), svrstala je sve prirodno sintetisane aflatoksine uključujući i AfM<sub>1</sub> u 1A grupu dokazanih karcinogena. Oni kod ljudi i životinja mogu da dovedu do pojave adenokarcinoma jetre. Zbog toga se s uz ostale karcinogene kontaminante, svrstavaju u jedinjenja od interesa.

Toksični efekti T-2 toksina, najčešće nastaju nakon peroralnog unošenja. U velikoj meri se metaboliše već u tankim crevima, te je biološka raspoloživost nepromenjenog T-2 toksina potencijalno veoma niska

Metabolička biotransformacija toksina se odvija u velikom broju ćelija, od kojih su najznačajniji hepatociti. Metabolizam T-2 toksina se odvija u dve faze. U prvoj fazi dolazi do formiranja polarnih jedinjenja tokom reakcija saponifikacije, hidrosilacije i deepoksidacije, dok se u drugoj fazi nastali metaboliti T-2 toksina konjuguju sa glukuronskom kiselinom.

Proces saponifikacije T-2 toksina se dešava pomoću enzima karboksilesteraze, koja deacetiliše C4 ostatak T-2 toksina, pri čemu prevashodno nastaje HT-2 toksin. Ovaj metabolit se razlaže dalje reakcijom hidrosilacije do T-2 triola, koji se zatim, u reakciji deepoksidacije, razlaže do T-2 tetraola, pri čemu se gubi toksičnost primarnog jedinjenja. S aspekta prisustva rezidua u namirnicama životinjskog porekla, trihoteceni, a naročito T-2 toksin, spadaju u manje značajne mikotoksine. Nakon unosa trihotecena ne dolazi do njihove bioakumulacije u telu životinje, odnosno, dolazi do njihove potpune eliminacije za 48h od momenta unošenja primarnog jedinjenja.

Kod brojlera E-III, E-IV, E-V i E-VI, grupe nisu detektovani ostaci T-2 toksina, HT-2 toksina T-2 triola i T-2 tetraola u ispitivanim tkivima. Razlog je jako brzo metabolisanje T-2 toksina, već za 24h od unošenja u organizam. Naši rezultati u saglasnosti su sa rezultatima (Stefanović i sar., 2023, Yang i sar., 2020).

Kod brojlera E-V i E-VI grupe nisu detektovane rezidue AfB<sub>1</sub> i njegovih metabolita u jetri i grudnoj muskulaturi, ispitivanih brojlera. Razlog je najverovatnije smanjena konzumacija hrane. Usled smanjene konzumacije, životinje su unosile manju količinu AfB<sub>1</sub>. Našu rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Stefanović i sar, 2023.



## 7. ZAKLJUČCI:

1. AfB<sub>1</sub> dodavan u hranu brojlera u koncentraciji od 0,1 mg/kg tokom 42 dana ispoljio je negativan uticaj na njihovu telesnu masu, prirast, konzumaciju hrane i koeficijent konverzije.
2. Primena preparata za detoksikaciju mikotoksina u hrani brojlera (0,2%), a u koju je dodavan i AfB<sub>1</sub> u koncentraciji od 0,1 mg/kg, imala je za posledicu višu telesnu masu tretiranih brojlera za 12,5% i niži KK za 4,55% u odnosu na brojlere koji su hranom dobijali samo AfB<sub>1</sub>. Međutim, iako su kod ovih brojlera zabeleženi bolji proizvodni rezultati, koji se mogu pripisati prisustvu detoksifikatora u hrani, do kraja ogleada svi negativni efekti AfB<sub>1</sub> nisu neutralisani.
3. Kod brojlera koji su tokom celog ogleada hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> detektovane su histopatološke promene u duodenumu, jetri, srcu i Bursa fabricii. Iste histopatološke promene u organima detektovane su i kod brojlera koji su uz AfB<sub>1</sub> hranom dobijali i detoksifikator, međutim promene su dokazane kod manjeg broja ptica i intezitet promena je bio slabiji dok su neke izostale.
4. Kod brojlera koji su hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> detektovane su njegove rezidue u jetri i to u koncentraciji od 0,235 µg/kg. Kod brojlera, koji su uz 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> dobijali i 0,2% detoksifikatora, detektovane su rezidue AfB<sub>1</sub> u jetri u koncentraciji od 0,12 µg/kg što je za 51,06% niže u odnosu na brojlere koji hranom nisu dobijali detoksifikator. Rezidue AfB<sub>1</sub> nisu detektovane u grudnoj muskulaturi brojlera obe grupe. Takođe, u jetri nisu detektovane rezidue AfM<sub>1</sub> (metabolita AfB<sub>1</sub>) kod brojlera obe grupe.
5. T-2 toksin dodavan u hranu brojlera u koncentraciji od 0,5 mg/kg tokom 42. dana ispoljio je negativan uticaj na telesnu masu, prirast, konzumaciju i koeficijent konverzije.
6. Brojleri koji su hranom uz 0,5 mg/kg T-2 toksina dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju imali su na kraju ogleada za 12,36 % više telesne mase i 4,55% niži koeficijent konverzije u odnosu na brojlere koji su hranom dobijali samo T-2 toksin. Iako su brojleri ove grupe imali bolje proizvodne rezultate u odnosu na brojlere koji su dobijali hranom T-2 toksin, do kraja ogleada nije došlo do potpunog neutralisanja negativnih efekata T-2 toksina na proizvodne rezultate. To znači da je ispitivani detoksifikator ostvario delimično protektivno dejstvo u odnosu na T-2 toksin.
7. Kod brojlera koji su tokom celog ogleada hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina detektovane su histopatološke promene u duodenumu, jetri, srcu i Bursa fabricii. Kod brojlera koji su tokom ogleada hranom dobijali 0,5 mg/kg T-2 toksina i 0,2% detoksifikatora, histopatološke promene su takođe dokazane u svim organima. Međutim, kod brojlera ove grupe, histopatološke promene su zabeležene kod manjeg broja životinja i bile su slabijeg intenziteta dok su neke izostale. Možemo zaključiti da je detoksifikator ostvario delimičnu zaštitu kod ispitivanih životinja.
8. Kod brojlera koji su hranom dobijali 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane, kao i T-2 toksin i 0,2% detoksifikatora mikotoksina u jetri i grudnoj muskulaturi nisu detektovane rezidue T-2 i HT-2 toksina, kao i T-2 triola i T-2 tetraola. Razlog je najverovatnije intenzivna biotransformacija T-2 toksina i brza eliminacija njegovih metabolita iz organizma nakon unošenja.
9. Kod brojlera koji su tokom ogleada hranom dobijali 0,1 mg/kg AfB<sub>1</sub> i 0,5 mg/kg T-2 toksina zabeležen je negativan uticaj oba toksina na telesnu masu, prirast, konzumaciju i koeficijent konverzije. Brojleri ove grupe imali su najniže telesne mase na kraju ogleada u odnosu na sve druge ogleadne grupe koje su dobijale toksine pojedinačno ili ovu kombinaciju toksina uz

dodatak detoksifikatora. Iz ovoga se može zaključiti da je u pitanju sinergistički negativan efekat dva mikotoksina. Tretirani brojleri konzumirali su za 11,66% i 11,82% manje hrane tokom celog oglada u odnosu na grupe brojlera koje su dobijale pojedinačne doze AfB1 i T-2 toksina.

10. Brojleri koji su hranom uz 0,1 mg/kg AfB1 i 0,5 mg/kg T-2 toksina dobijali i 0,2% preparata za detoksikaciju mikotoksina imali su samo 2,88% više prosečne TM u odnosu na brojlere E-V grupe (bez detoksifikatora). Možemo zaključiti da je usled negativnog sinergističkog dejstva dva mikotoksina došlo do smanjene konzumacije hrane, što je dovelo do značajnog pada proizvodnih rezultata. Istovremeno zbog unošenja manje količine toksina nije došlo do potpune ekspresije štetnih efekata oba mikotoksina.
11. Kod brojlera koji su tokom celog oglada hranom dobijali 0,1 mg AfB1 i 0,5 mg T-2 toksina/kg hrane detektovane su histopatološke promene u duodenumu, jetri, srcu i Bursa fabricii. Brojleri ove grupe imali su histopatološke promene zastupljene kod najvećeg broja životinja. Kod brojlera grupe koji su tokom celog oglada hranom dobijali 0,1 mg AfB1 i 0,5 mg/T-2 toksina i 0,2% preparata za detoksikaciju detektovane su takođe iste histopatološke promene u svim organima. Međutim, kod brojlera ove grupe, histopatološke promene su zabeležene kod manjeg broja ptica i bile su slabijeg intenziteta dok su neke potpuno izostale. Možemo smatrati da je detoksifikator mikotoksina ostvario delimičnu zaštitu od istovremenog štetnog dejstva dva mikotoksina kod ispitivanih životinja.
12. U jetri i grudnoj muskulaturi brojlera koji su hranom dobijali AfB1 i T-2 toksin, kao i kombinaciju ova dva toksina i 0,2% detoksifikatora mikotoksina, nisu detektovane rezidue AfB1, AfM1, T-2 i HT-2 toksina, kao i T-2 triola i T-2 tetraola. Razlog je najverovatnije smanjena konzumacija hrane, a samim tim i manje unošenje toksina.

## 8. LITERATURA

1. Abbas, H., Wilkinson, J., Zablutowicz, R., Accinelli, C., Abel, C., Bruns, H., i Weaver, M. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin reviews*, 28(2-3), 142-153.
2. Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Bruns, H. A., i Abel, C. A. (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5), 437-449.
3. Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairy, A. A., Kaushik, N. K., i Choi, E. H. (2017a). T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8(20). <https://www.oncotarget.com/article/15422/text/>
4. Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairy, A. A., Kaushik, N. K., i Choi, E. H. (2017b). T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8(20), 33933.
5. Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Hajeb, P., Radu, S., i Shakibazadeh, S. (2013). A Review on Mycotoxins in Food and Feed: Malaysia Case Study. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 12(6), 629-651.
6. Afsah - Hejri, L., Jinap, S., Hajeb, P., Radu, S., i Shakibazadeh, S. (2013). A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 629-651.
7. Akande, K., Abubakar, M., Adegbola, T., i Bogoro, S. (2006). Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: a review.
8. Alam, S., Khan, N.A., Muhammad, A., Jan, I., Hashmi, M.,S., Khan, A. i Khan, M.O. (2020). *Fresenius environmental bulletin*, 29, 214-221.
9. Ali, A., Ponnampalam, E.N., Pushpakumara, G., Cottrell, J.J., Suleria, H.A.R. i Dunshea, F.R. (2021). Cinnamon: A Natural Feed Additive for Poultry Health and Production—A Review. *Animals*, 11(7), 2026.
10. Alperden, İ., i Karaali, A. (1990). Moulds and mycotoxins in Turkish Fostuffs Nato-tu-mycotoxins.
11. Alptekin, Y., Duman, A. D., i Akkaya, M. R. (2009). Identification of fungal genus and detection of aflatoxin level in second crop corn grain. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(9), 1777-1779.
12. Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L., i Wogan, G. N. (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*, 85(11), 1706-1707.
13. Ates, M. B., i Ortatatli, M. (2021). The effects of *Nigella sativa* seeds and thymoquinone on aflatoxin phase-2 detoxification through glutathione and glutathione-S-transferase alpha-3, and the relationship between aflatoxin B1-DNA adducts in broilers. *Toxicon*, 193, 86-92.
14. Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of stored products research*, 5(2), 127-141.
15. Azizpour, A., i Moghadam, N. (2015). Effects of yeast glucomannan and sodium bentonite on the toxicity of aflatoxin in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17, 7-13.
16. Bankole, S., i Adebajo, A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: Current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology*, 2, 254-263.
17. Bata, A., Ványi, A., i Lásztity, R. (1983). Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 66(3), 577-581.
18. Bauer, J. (1995). The metabolism of trichothecenes in swine. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 102(1), 50-52.
19. Bhat, R., Rai, R. V., i Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 9(1), 57-81.
20. Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K., Yu, J., i Cleveland, T. E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162(3), 155-166.
21. Bhatnagar, D., Ehrlich, K., i Cleveland, T. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 61, 83-93.

22. Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., i Cleveland, T. E. (1992). Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites. Handbook of applied mycology Volume, 5 Mycotoxins in ecological systems, 255-286. <https://eurekamag.com/research/002/451/002451085.php>
23. Bibani, N., Khidhir, Z., Shaker, A., Kirkuki, S., i Abdulateef, S. (2019). Analyses of mycotoxins in broiler's local and imported feeds. Iraqi journal of veterinary sciences, 33(2), 267-271.
24. Bitay, Z., Glavits, R., Sandor, G., i Balazs, K. (1981). A Case of T-2 Mycotoxicosis in Broiler Chicks. Magyar Allatorvosok Lapja, 36(7), 491-495.
25. Bočarov-Stančić, A., Milovac, M., i Gološin, B. (2000). Nalaz mikotoksina u žitaricama i stočnoj hrani. Savetovanje ITNMS, Beograd.
26. Bouaziz, C., El Golli, E., Abid-Essefi, S., Brenner, C., Lemaire, C., i Bacha, H. (2008). Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. Toxicology, 254(1-2), 19-28.
27. Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., i Socaciu, C. (2008). Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin a in different cereals cultivated in Romania using thin - layer chromatography - densitometry. Journal of Food Quality, 31(1), 108-120.
28. Butler, W. (1974). Aflatoxin in "Mycotoxins" ed. IFH Purchase, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York.
29. Calnek, B., Barnes, H., Beard, C., McDougald, L., i Saif, Y. (1997). Diseases of poultry 10th ed. Poult. Sci, 87, 1643-1648.
30. Canady, R. A., Coker, R. D., Egan, S. K., Krska, R., Olsen, M., Resnik, S., i Schlatter, J. (2001). T-2 and HT-2 toxins. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series, 47, 557-597.
31. Carnaghan, R., Hartley, R., i O'Kelly, J. (1963). Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. Nature, 200(4911), 1101-1101.
32. Cary, J. W., i Calvo, A. M. (2008). Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. Toxin reviews, 27(3-4), 347-370.
33. Casarin, A., Forat, M., Soto, E., i Zaviezo, D. (2006). Evaluation of the efficacy of a commercial purified phyllosilicate to reduce the toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. Poultry Sci, 85, 201-202.
34. Chain, E. P. o. C. i. t. F. (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T - 2 and HT - 2 toxin in food and feed. EFSA Journal, 9(12), 2481.
35. Chang, P.-K. (2003). The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. Molecular Genetics and Genomics, 268, 711-719.
36. Chi, M., Robison, T., Mirocha, C., Swanson, S., i Shimoda, W. (1978). Excretion and tissue distribution of radioactivity from tritium-labeled T-2 toxin in chicks. Toxicology and Applied Pharmacology, 45(2), 391-402.
37. Cinti, F., Bortolotti, M., i Casagrandi, M. (2005). Relationship between the aflatoxin content of maize grain and the feeds that contain it.
38. Commission Regulation (EC) No 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives (Text with EEA relevance).
39. Corrier, D. (1991). Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. Veterinary immunology and immunopathology, 30(1), 73-87.
40. Coulombe Jr, R. A. (1993). Biological action of mycotoxins. Journal of Dairy Science, 76(3), 880-891.
41. Curtui, V., Usleber, E., Dietrich, R., Lepschy, J., i Märtilbauer, E. (1998). A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. Mycopathologia, 143, 97-103.
42. Dai, C., Gupta, S.D., Wang, Z., Jiang, H., Velkov, T. i Shen, J. (2022). T-2 toxin and its cardiotoxicity: New insights on the molecular mechanisms and therapeutic implications. Food and chemical toxicology, volume 167, 113262.
43. De Colli, L., De Ruyck, K., Abdallah, M. F., Finnan, J., Mullins, E., Kildea, S., Spink, J., Elliott, C., i Danaher, M. (2021). Natural co-occurrence of multiple mycotoxins in unprocessed oats grown in Ireland with various production systems. Toxins, 13(3), 188.



44. De Freitas Souza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Petrolli, T. G., da Glória, E. M., Zanette, R. A., i Da Silva, A. S. (2020). Dietary vegetable choline improves hepatic health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-contaminated diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 227, 108614.
45. Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C., Oldano, F., d'Aosta, V., Ruffier, M., d'Aosta, V., i Sezian, A. (2005). Aflatoxin emergency in feedstuffs and in milk: 2004 Valle d'Aosta state. *Tecnica Molitoria (Italy)*, 56(7).
46. Degen, G. H., i Neumann, H.-G. (1978). The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate. *Chemico-biological interactions*, 22(2-3), 239-255.
47. Degen, G. H., i Neumann, H.-G. (1981). Differences in aflatoxin B 1-susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B 1-epoxide. *Carcinogenesis*, 2(4), 299-306.
48. Denli, M., Blandon, J., Guynot, M., Salado, S., i Perez, J. (2009). Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poultry Science*, 88(7), 1444-1451.
49. Denli, M., i Okan, F. (2006). Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B1 in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*, 36(4), 222-228.
50. Dersjant-Li, Y., Verstegen, M. W., i Gerrits, W. J. (2003). The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition research reviews*, 16(2), 223-239.
51. Devegowda, G., i Aravind, K. (2002). Mycotoxins: Economic risk and control. *Grain and Feed Milling Technology*, April-May, 13-16.
52. Devegowda, G., Raju, M., Nazar Afzali, N. A., i Swamy, H. (1998). Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction.
53. Devreese, M., De Backer, P., i Croubels, S. (2013). Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82(4).
54. Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., i Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. *Aflatoxins-Biochemistry and molecular biology*, 10(22717), 221-254.
55. Diaz, G., Cortes, A., i Roldan, L. (2005). Evaluation of the efficacy of four feed additives against the adverse effects of T-2 toxin in growing broiler chickens. *Journal of applied poultry research*, 14(2), 226-231.
56. Doerr, J., Wyatt, R., i Hamilton, P. (1976). Impairment of coagulation function during aflatoxicosis in young chickens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 35(3), 437-446.
57. Doerr, J., Huff, W., Tung, H., Wyatt, R., & Hamilton, P. (1974). A survey of T-2 toxin, ochratoxin and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chickens. *Poultry science*, 53(5), 1728-1734.
58. Doerr, J., Hamilton, P., i Burmeister, H. (1981). T-2 toxicosis and blood coagulation in young chickens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 60(2), 157-162.
59. Dohnal, V., Wu, Q., i Kuča, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of toxicology*, 88, 1635-1644.
60. Doi, K., Ishigami, N., & Sehata, S. (2008). T-2 toxin-induced toxicity in pregnant mice and rats. *Int J Mol Sci*, 9(11), 2146-2158.
61. Dvořáčková, I. (1989). *Aflatoxins and human health*. CRC Press.
62. Dvorska, J., i Surai, P. (2001). Effects of T-2 toxin, zeolite and Mycosorb on antioxidant systems of growing quail. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(12), 1752-1757.
63. Edwards, S. G. (2009). *Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat*. *Food Additives and Contaminants*, 26(4), 496-506.
64. EFSA. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products (slika). *EFSA Journal*, 5(3), 446.

65. EFSA. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change (slika). EFSA Supporting Publications, 9(1), 223E.
66. Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., i Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2773-2789.
67. Espada, Y., Domingo, M., Gomez, J., i Calvo, M. (1992). Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 53(3), 275-279.
68. European Commission, (2013). EU Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2013/165/EU). *Off J Eur Comm L*, 91, 12-15.
69. Evans, J., i Dawson, K. A. (2000). The ability of Mycosorb to bind toxins present in endophyte-infected tall fescue.
70. Fazekas, B., Tóthné Hajdu, E., i Tanyi, J. (2000). Effect of MYCO-AD on experimental T-2 toxicosis in broiler chickens.
71. Feinberg, B., i McLaughlin, C. S. (2017). Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiological Effects* (1989) (pp. 27-36). CRC Press.
72. Fink-Gremmels, J. (2005). *Mycotoxins in forages*.
73. Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 172-180.
74. Fouad, A.M., Ruan, D., El-Senousey, H.A.K., Chen, W., Jang, S. i Zheng, C. (2019). Harmful effects and control strategies of aflatoxin B<sub>1</sub> produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry: Review. *Toxins (Basel)*; 11(3): 176.
75. Gareis, M. (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Report of Experts Participating in SCOOP Task 3.2. 10-Part A: Trichothecene, 13-235.
76. Giray, B., Atasayar, S., i Sahin, G. (2009). Determination of ochratoxin A and total aflatoxin levels in corn samples from Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycotoxin Research*, 25, 113-116.
77. Girish, C., i Devegowda, G. (2006). Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb®) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(6), 877-883.
78. Giroir, L. E., Ivie, G. W., i Huff, W. E. (1991). Comparative fate of the tritiated trichothecene mycotoxin, T-2 toxin, in chickens and ducks. *Poultry Science*, 70(5), 1138-1143.
79. Godovikov, A. A. (1983). *Mineralogija*. Nedra.
80. Gosal, S. S., Wani, S. H., i Kang, M. S. (2009). Biotechnology and drought tolerance. *Journal of Crop Improvement*, 23(1), 19-54.
81. Grabarević, Ž., Nemanič, A., Jagić, V., Tišljarić, M., Artuković, B., Džaja, P., Čuljak, K., i Rinck, I. (1992). Subacute toxicity of T-2 toxin and DAS in broiler chicks.
82. Gu, W., Bao, Q., Weng, K., Liu, J., Luo, S., Chen, J., Li, Z., Cao, Z., Zhang, Y., Zhang, Y., Chen, G., i Xu, Q. (2023). Effects of T-2 toxin on growth performance, feather quality, tibia development and blood parameters in Yangzhou goslings. *Poult Sci*, 102(2), 102382.
83. Gürbay, A., Sabuncuoğlu, S. A., Girgin, G., Şahin, G., Yiğit, Ş., Yurdakök, M., i Tekinalp, G. (2010). Exposure of newborns to aflatoxin M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 314-319.
84. Gursoy, N., i Bicici, M. (2003). Determination of fungal infections on wheat and maize grains and some of their mycotoxins in Cukurova region. I National Mycotoxins Symposium. Instambul, Turkey,
85. Hamid, A. S., Tesfamariam, I. G., Zhang, Y., i Zhang, Z. G. (2013). Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncology letters*, 5(4), 1087-1092.
86. Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H.-J., Monien, B., Rietjens, I., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P., i Eisenbrand, G. (2020). Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens (slika). *Archives of Toxicology*, 94.

87. Harvey, R., Huff, W., Kubena, L., Corrier, D., i Phillips, T. (1988). Progression of aflatoxicosis in growing barrows. *American journal of veterinary research*, 49(4), 482-487.
88. Hayes, J. D., Judah, D. J., McLellan, L. I., i Neal, G. E. (1991). Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacology & therapeutics*, 50(3), 443-472.
89. Henghold, W. B. (2004). Other biologic toxin bioweapons: ricin, staphylococcal enterotoxin B, and trichothecene mycotoxins. *Dermatologic clinics*, 22(3), 257-262.
90. Hietaniemi, V., Rämö, S., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Peltonen, S., Kartio, M., Sieviläinen, E., Koivisto, T., i Parikka, P. (2016). Updated survey of Fusarium species and toxins in Finnish cereal grains. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(5), 831-848.
91. Hoerr, F., Carlton, W., i Yagen, B. (1981). Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 18(5), 652-664.
92. Hoerr, F., Carlton, W., Yagen, B., i Joffe, A. (1982). Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T - 2 toxin or diacetoxyscirpenol. *Avian Pathology*, 11(3), 369-383.
93. Horn, B. W., i Dorner, J. W. (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*, 90(5), 767-776.
94. Hossam, E. (2013). Mycotoxins-induced oxidative stress and disease, mycotoxin and food safety in developing countries. Makun, HA InTech, Croatia. pp, 63-92.
95. Hsieh, D., Wong, Z., Wong, J., Michas, C., i Ruebner, B. (1977). Comparative metabolism of aflatoxin. *Mycotoxins in human and animal health*, 37-50.
96. Hsieh, D. P., Salhab, A. S., Wong, J. J., i Yang, S. L. (1974). Toxicity of aflatoxin Q1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 30(2), 237-242.
97. Hsieh, D. P., i Wong, J. J. (1994). Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. *The Toxicology of Aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*, 73-88.
98. Huff, W., Kubena, L., Harvey, R., Corrier, D., i Mollenhauer, H. (1986). Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 65(10), 1891-1899.
99. Hussain, Z., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M. K., Mahmood, S., i Asi, M. R. (2010). Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3304-3307.
100. IARC. (1987). Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Retrieved from <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>
101. IARC. (2002). Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
102. International Agency for Research on Cancer, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. World Health Organization.
103. Indresh, H., i Umakantha, B. (2013). Effects of ochratoxin and T-2 toxin combination on performance, biochemical and immune status of commercial broilers.
104. Iyer, R. S., Voehler, M. W., i Harris, T. M. (1994). Adenine adduct of aflatoxin B1 epoxide. *Journal of the American Chemical Society*, 116(20), 8863-8869.
105. Jacobson, W., i Wiseman, H. (1974). The transmission of aflatoxin B1 into eggs. *Poultry Science*, 53(5), 1743-1745.
106. Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Stela, M. i Bijak, M. (2021). T-2 Toxin—The Most Toxic Trichothecene Mycotoxin: Metabolism, Toxicity, and Decontamination Strategies. *Molecules*, 26(22), 6868.
107. Jaradat, Z. W. (2005). T-2 mycotoxin in the diet and its effects on tissues. In *Reviews in Food and Nutrition Toxicity, Volume 4* (pp. 173-212). CRC Press.
108. Jarvis, B. B. (2002). Chemistry and toxicology of molds isolated from water-damaged buildings. *Adv Exp Med Biol*, 504, 43-52.
109. Joffe, A. Z. (1986). *Fusarium species: their biology and toxicology*.

110. Joffe, A. Z., i Yagen, B. (1978). Intoxication produced by toxic fungi *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* on chicks. *Toxicon*, 16(3), 263-273.
111. Jouany, J., i Diaz, D. (2005). Effects of mycotoxins in ruminants. *The mycotoxin blue book*, 295-321.
112. Kana, J., Teguaia, A., i Tchoumboue, J. (2010). Effect of dietary plant charcoal from *Canarium schweinfurthii* Engl. and maize cob on aflatoxin B1 toxicosis in broiler chickens. *Advances in Animal Biosciences*, 1(2), 462-463.
113. Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M., i Sarkari, S. (2012). Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control*, 23(1), 271-274.
114. Klich, M., Tiffany, L., i Knaphus, G. (1992). Ecology of the Aspergilli of soils and litter.
115. Knutsen, H. K., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Nebbia, C., Oswald, I., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., i Alexander, J. (2017). Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms (slika). *EFSA Journal*, 15.
116. Konjević, D., Srebočan, E., Gudan, A., Lojkić, I., Severin, K., i Sokolović, M. (2004). A pathological condition possibly caused by spontaneous trichotecene poisoning in Brahma poultry: first report. *Avian Pathology*, 33(3), 377-380.
117. Kos, J. (2015). Aflatoksini: analiza pojave, procena rizika i optimizacija metodologije određivanja u kukuruзу i mleku University of Novi Sad (Serbia)].
118. Krska, R., Malachova, A., Berthiller, F., i Van Egmond, H. (2014). Determination of T-2 and HT-2 toxins in food and feed: An update. *World Mycotoxin Journal*, 7(2), 131-142.
119. Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., i Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology*, 7, 235289.
120. Lakkawar, A., Narayanaswamy, H., i Satyanarayana, M. (2017). Study on efficacy of diatomaceous earth to ameliorate aflatoxin-induced pathomorphological changes in lymphoid organs of broiler chicken. *Veterinária*, 66(3).
121. Leeson, S., Diaz, G. J., i Summers, J. D. (1995). Poultry metabolic disorders and mycotoxins. (No Title).
122. Lević, J., Gošić-Dondo, S., Ivanović, D., Stanković, S. Ž., Krnjaja, V., Bočarov-Stančić, A. S., i Stepanić, A. (2013). An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 28(3), 167-179.
123. Lindemann, M., Blodgett, D., Kornegay, E., i Schurig, G. (1993). Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. *Journal of Animal Science*, 71(1), 171-178.
124. Liu, N., Ding, K., Wang, J., Deng, Q., Gu, K., i Wang, J. (2018). Effects of lactic acid bacteria and smectite after aflatoxin B1 challenge on the growth performance, nutrient digestibility and blood parameters of broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(4), 953-961.
125. Lizárraga-Paulín, E. G., Moreno-Martínez, E., i Miranda-Castro, S. P. (2011). Aflatoxins and their impact on human and animal health: an emerging problem. *Aflatoxins-Biochemistry and molecular biology*, 13, 255-262.
126. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., i Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
127. Loeffler, K., i Miderson, S. (2010). Photo of aflatoxin in corn kernel. Cornell University Department of Plant Pathology and Plant Microbe-Biology, Ithaca, USA. <http://www.plantpath.cornell.edu>
128. Loi, M., Paciolla, C., Logrieco, A., i Mule, G. (2020). Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction (slika). *Frontiers in Microbiology*, 11.
129. Lozano, M., i Diaz, G. (2006). Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species. *British Poultry Science*, 47(6), 734-741.
130. Magan, N., Sanchis, V., i Aldred, D. (2004). The role of spoilage fungi in seed deterioration. *Mycology series*, 21, 311-324.
131. Magnoli, A., Monge, M., Miazzo, R., Cavaglieri, L., Magnoli, C., Merkis, C., Cristofolini, A., Dalcerro, A., i Chiacchiera, S. (2011). Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters,

- and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poultry Science*, 90(1), 48-58.
132. Marín, S., Albareda, X., Ramos, A. J., i Sanchis, V. (2001). Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(11), 1060-1068.
  133. Mašić, Z., Bočarov-Stančić, A., Sinovec, Z., Đilas, S., i Adamović, M. (2003). Mikotoksini u hrani za životinje u Republici Srbiji. X Simpozijumu „Tehnologija hrane za životinje”(sa međunarodnim učešćem), 19(23), 10.2003.
  134. Matsumoto, H., Ito, T., i Ueno, Y. (1978). Toxicological approaches to the metabolites of fusaria. XII. Fate and distribution of T-2 toxin in mice. *The Japanese journal of experimental medicine*, 48(5), 393-399.
  135. McLean, M., i Dutton, M. F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther*, 65(2), 163-192.
  136. Meier, W. M., Olson, D. H., i International Zeolite Association. Structure Commission. (1987). Atlas of zeolite structure types (2nd rev. ed.). Published on behalf of the Structure Commission of the International Zeolite Association, by Butterworths.
  137. Meyer, J. C., Hennies, I., Wessels, D., i Schwarz, K. (2021). Survey of mycotoxins in milling oats dedicated for food purposes between 2013 and 2019 by LC–MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(11), 1934-1947.
  138. Miazzo, R., Rosa, C. A., De Queiroz Carvalho, E. C., Magnoli, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., Saenz, M., Kikot, A., Basaldella, E., i Dalcerro, A. (2000). Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poult Sci*, 79(1), 1-6.
  139. Micco, C., Grossi, M., Onori, R., Chirico, M., i Brera, C. (1986). Monitoring for aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in Italian maize of the 1982, 1983 and 1984 crops. *Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 15, 113-116.
  140. Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Brera, C., Mantovani, A., Ioppolo, A., i Stasolla, D. (1988). Long - term administration of low doses of mycotoxins to poultry. 1. Residues of aflatoxin B1 and its metabolites in broilers and laying hens. *Food Additives & Contaminants*, 5(3), 303-308.
  141. Mishra, S. K., i Swain, B. K. (2022). Aflatoxin Occurrence, Detection, and Novel Strategies to Reduce Toxicity in Poultry Species. In *Aflatoxins-Occurrence, Detection and Novel Detoxification Strategies*. IntechOpen.
  142. Mohsenzadeh, M. S., Hedayati, N., Riahi-Zanjani, B., i Karimi, G. (2016). Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. *Toxin reviews*, 35(3-4), 121-127.
  143. Monson, M.S., Coulombe, R.A. i Reed, K.M. (2015). Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry. *Agriculture*, 5(3), 742-777.
  144. Morcia, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., Badeck, F. W., Lattanzio, V. M., Pascale, M., i Terzi, V. (2016). Occurrence of *Fusarium langsethiae* and T-2 and HT-2 toxins in Italian malting barley. *Toxins*, 8(8), 247.
  145. Moreau, C. (1979). *Moulds, toxins, and food*. Wiley.
  146. Moreno-Martinez, E., Chapa-Oliver, A., Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R., Vazquez-Cruz, M., i Preciado-Ortiz, R. (2011). Genetic resistance to drought in maize and its relationship in aflatoxins production. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*. Rijeka: InTech, 151-161.
  147. Mostrom, M. S., i Raisbeck, M. F. (2012). Trichothecenes. In *Veterinary Toxicology* (pp. 1239-1265). Elsevier.
  148. Muller, R., Carlson, C., Semeniuk, G., i Harshfield, G. (1970). The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poults to graded levels of aflatoxins. *Poultry Science*, 49(5), 1346-1350.
  149. Mungamuri, S. K., i Mavuduru, V. A. (2020). Role of epigenetic alterations in aflatoxin - induced hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer International*, 1(2), 41-50.
  150. Nakazato, M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T., i Kasai, N. (1990). Interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxicol by several fungi. *Applied and environmental microbiology*, 56(5), 1465-1470.

151. Neal, G., i Colley, P. (1979). The formation of 2, 3-dihydro-2, 3-dihydroxy aflatoxin B1 by the metabolism of aflatoxin B1 in vitro by rat liver microsomes. *FEBS letters*, 101(2), 382-386.
152. Neldon-Ortiz, D., i Qureshi, M. (1992). The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B1 on chicken peritoneal macrophages in vitro. *Veterinary immunology and immunopathology*, 31(1-2), 61-76.
153. Nelson, P. E., Desjardins, A. E., i Plattner, R. D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by fusarium species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol*, 31, 233-252.
154. Nešić, K., Resanović, R., Jakić-Dimić, D., i Nešić, V. (2011). Efficiency of various feed additives on the performance of broilers treated with T-2 toxin. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(3), 705-711.
155. Nešić, V. (2007). Ispitivanje efikasnosti odabranih dodataka hrani na ublažavanje štetnih efekata T-2 toksina kod brojlera: doktorska disertacija (Publication Number 619:616-084:636.5(043.3)) Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.]. Beograd.
156. Nizamlyolu, F., i Oguz, H. (2003). Occurrence of aflatoxins in layer feed and corn samples in Konya province, Turkey. *Food Additives & Contaminants*, 20(7), 654-658.
157. Nyangi, C., Beed, F., Mugula, J., Boni, S., Koyano, E., Mahuku, G., Sulyok, M., i Bekunda, M. (2016). Assessment of pre-harvest aflatoxin and fumonisin contamination of maize in Babati District, Tanzania. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 16(3), 11039-11053.
158. Obremski, K., Podlasz, P., Żmigrodzka, M., Winnicka, A., Woźny, M., Brzuzan, P., Jakimiuk, E., Wojtacha, P., Gajęcka, M., i Zielonka, Ł. (2013). The effect of T-2 toxin on percentages of CD4+, CD8+, CD4+ CD8+ and CD21+ lymphocytes, and mRNA expression levels of selected cytokines in porcine ileal Peyer's patches. *Polish Journal of Veterinary Sciences*(2).
159. Organization, W. H. (1990). Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot-environmental health criteria 105.
160. Oruc, H. H., Cengiz, M., i Kalkanli, O. (2006). Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3-4), 337-341.
161. Oruç, H. H., Cengiz, M., i Uzunoğlu, İ. (2007). Occurrence of aflatoxin b1 and t-2 toxin in feed and raw ingredients used for animal feeding stuffs.
162. Osborne, D., Huff, W., Hamilton, P., i Burmeister, H. (1982). Comparison of ochratoxin, aflatoxin, and T-2 toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoids in chickens. *Poultry Science*, 61(8), 1646-1652.
163. Özay, G., i Heperkan, D. (1989). Mould and mycotoxin contamination of stored corn in Turkey. *Mycotoxin Research*, 5(2), 81-89.
164. Pande, V., Kurkure, N., i Bhandarkar, A. (2006). Effect of T-2 toxin on growth, performance and haematobiochemical alterations in broilers.
165. Pandey, V., Kurkure, N., Kalorey, D., i Bhandarkar, A. (2005). Detection of residual T2 toxin in liver and muscle of experimentally toxicated broilers.
166. Pasha, T. N., Farooq, M. U., Khatkhat, F., Jabbar, M., i Khan, A. (2007). Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 132(1-2), 103-110.
167. Payne, G. A. (1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. *Mycotoxins in agriculture and food safety*, 9, 279-306.
168. Pestka, J. J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal feed science and technology*, 137(3-4), 283-298.
170. Pier, A., i McLoughlin, M. (1985). Mycotoxic suppression of immunity. *Trichothecenes and other mycotoxins*. New York: Wiley, 85, 507-519.
171. Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., i Piva, G. (2004). Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants*, 21(5), 479-487.
172. Piva, G., Battilani, P., i Pietri, A. (2006). Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy. In *The mycotoxin factbook* (pp. 139-153). Wageningen Academic.
173. Placinta, C., D'Mello, J. F., i Macdonald, A. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78(1-2), 21-37.

174. Pleadin, J., Perši, N., Mitak, M., Zadavec, M., Sokolović, M., Vulić, A., Jaki, V., i Brstilo, M. (2012). The natural occurrence of T-2 toxin and fumonisins in maize samples in Croatia. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88, 863-866.
175. Pleadin, J., Vasilj, V., Kudumija, N., Petrović, D., Vilušić, M., i Škrivanko, M. (2017). Survey of T-2/HT-2 toxins in unprocessed cereals, food and feed coming from Croatia and Bosnia & Herzegovina. *Food Chemistry*, 224, 153-159.
176. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., i Cvetnić, Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
177. Pokrovsky, A., Kravchenko, L., i Tutelyan, V. (1972). Effect of aflatoxin on rat liver lysosomes. *Toxicol*, 10(1), 25-30.
178. Poloni, V., Dogi, C., Pereyra, C. M., Fernandez Juri, M. G., Köhler, P., Rosa, C. A., Dalcero, A. M., i Cavaglieri, L. R. (2015). Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B1. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(6), 970-976.
179. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, "Službeni glasnik RS", 4/2010 i 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 i 54/2017, (2010-2017.). <https://pravno-informacioni-sistem.rs/eli/rep/sgrs/ministarstva/pravilnik/2010/4/10/20170608>
180. Rahman, S., Sharma, A. K., Singh, N. D., i Prawez, S. (2021). Immunopathological effects of experimental T-2 mycotoxicosis in Wistar rats. *Human & experimental toxicology*, 40(5), 772-790.
181. Rai, R., Rahman, S., Dixit, H., Rai, S., Singh, B., Kumar, H., Damodaran, T., i Dhama, K. (2011). Analysis of feed ingredients for Afla and T-2 mycotoxins by ELISA in rural areas of Uttar Pradesh.
182. Raj, J., Farkaš, H., Jakovčević, Z., Vasiljević, M., Kumar, R., i Asrani, R. K. (2023). Effects of supplemented multicomponent mycotoxin detoxifying agent in laying hens fed aflatoxin B1 and T2-toxin contaminated feeds. *Poultry Science*, 102(8), 102795.
183. Rajput, S. A., Sun, L., Zhang, N., Khalil, M. M., Gao, X., Ling, Z., Zhu, L., Khan, F. A., Zhang, J., i Qi, D. (2017). Ameliorative effects of grape seed proanthocyanidin extract on growth performance, immune function, antioxidant capacity, biochemical constituents, liver histopathology and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Toxins*, 9(11), 371.
184. Raju, M., i Devegowda, G. (2000). 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(5), 640-650.
185. Reid, E., Cook, G. M. W., i Morré, D. J. (1982). *Cancer-cell organelles* / edited by E. Reid, G.M.W. Cook and D.J. Morré. E. Horwood.
186. Rizzo, A., Atroshi, F., Ahotupa, M., Sankari, S., i Elovaara, E. (1994). Protective effect of antioxidants against free radical - mediated lipid peroxidation induced by DON or T - 2 toxin. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 41(1 - 10), 81-90.
187. Rocha, O., Ansari, K., i Doohan, F. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 369-378.
188. Rodrigues, I., Handl, J., i Binder, E. M. (2011). Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 4(3), 168-179.
189. Roebuck, B. D., Siegel, W. G., i Wogan, G. N. (1978). In vitro metabolism of aflatoxin B2 by animal and human liver. *Cancer Research*, 38(4), 999-1002.
190. Rosenstein, Y., i Lafarge-Frayssinet, C. (1983). Inhibitory effect of Fusarium T2-toxin on lymphoid DNA and protein synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 70(2), 283-288.
191. Rushing, B. R., i Selim, M. I. (2018). Adduction to arginine detoxifies aflatoxin B1 by eliminating genotoxicity and altering in vitro toxicokinetic profiles. *Oncotarget*, 9(4), 4559.
192. Rustom, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57-67.
193. Sarker, M.T., Wan, X.L., Yang, H.M. i Wang, Z.Y. (2023). AflatoxinB1 (AFB1) and its toxic effect on the broilers intestine: A review. *Veterinary medicine and science.*, 9(4): 1646–1655.

194. Sassahara, M., Netto, D. P., i Yanaka, E. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. *Food and Chemical Toxicology*, 43(6), 981-984.
195. Sawhney, D., Vadehra, D., i Baker, R. (1973). The metabolism of <sup>14</sup>C aflatoxins in laying hens. *Poultry Science*, 52(4), 1302-1309.
196. Scheuer, P. J., i Chalk, B. T. (1986). *Clinical tests, histopathology*. Wolfe Medical Publications.
197. Schiefer, H., Rousseaux, C., Hancock, D., i Blakley, B. (1987). Effects of low-level long-term oral exposure to T-2 toxin in CD-1 mice. *Food and Chemical Toxicology*, 25(8), 593-601.
198. Schindler, A., Palmer, J. G., i Eisenberg, W. (1967). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Applied Microbiology*, 15(5), 1006-1009.
199. Schmidt, C. W. (2013). Breaking the mold: new strategies for fighting aflatoxins. *Environ Health Perspect*, 121(9), A270-275.
200. Schuhmacher - Wolz, U., Heine, K., i Schneider, K. (2010). Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT - 2 and T - 2 toxins. *EFSA Supporting Publications*, 7(7), 65E.
201. Sharma, R. P. (1993). Immunotoxicity of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 892-897.
202. Singh, R., Mandal, A., i Biswas, A. *Mycotoxicosis and its management in poultry*. Avian Nutrition and Feed Technology Division. Izatnagar, India: Central Avian Research Institute. 2019. In.
203. Singh, R., Park, S., Koo, J. S., Kim, I. H., i Balasubramanian, B. (2020). Significance of varying concentrations of T-2 toxin on growth performance, serum biochemical and hematological parameters in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(4), 468.
204. Sinha, R. N. (1995). The stored-grain ecosystem. *Stored grain ecosystems*, 1-32.
205. Sinovec, S. M. (1991). Uticaj T-2 toksina na razvoj patomorfoloških promena u jetri, bubrezima i srcu pacova i mogućnost forenzičke procene [Magistarska teza]. Veterinarski fakultet. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
206. Sinovec, S. M., Jovanović, M. M., Škaro-Milič, A., i Aleksić, Z. (1996). Patohistološke i ultrastrukturne promene u jetri i srcu pacova tretiranih T-2 toksinom i procena mogućnosti njihove restitucije: doktorska disertacija.
207. Sklan, D., Klipper, E., Friedman, A., Shelly, M., i Makovsky, B. (2001). The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and aflatoxin on performance, health, and antibody production in chicks. *Journal of applied poultry research*, 10(1), 79-85.
208. Śliżewska, K., Cukrowska, B., Smulikowska, S., i Cielecka-Kuszyk, J. (2019). The effect of probiotic supplementation on performance and the histopathological changes in liver and kidneys in broiler chickens fed diets with aflatoxin B1. *Toxins*, 11(2), 112.
209. Smith, J., i Hamilton, P. (1970). Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Science*, 49(1), 207-215.
210. Sokolović, M., i Šimpraga, B. (2006). Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, 17(9), 733-740.
211. Solis-Cruz, B., Hernandez-Patlan, D., Petrone, V. M., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Beyssac, E., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Owens, C., i Hargis, B. M. (2019). Evaluation of cellulosic polymers and curcumin to reduce aflatoxin B1 toxic effects on performance, biochemical, and immunological parameters of broiler chickens. *Toxins*, 11(2), 121.
212. Southern, L., i Clawson, A. (1979). Effects of aflatoxins on finishing swine. *Journal of Animal Science*, 49(4), 1006-1011.
213. Spirić, D. M., Đinović, J. M., Janković, V. V., Velebit, B. M., Radičević, T. M., Stefanović, S. M., i Janković, S. D. (2015). Study of aflatoxins incidence in cow feed and milk in Serbia during 2013. *Hemijaska industrija*, 69(6), 651-656.
214. Stefanović, D., Marinković, D., Trailović, S., Vasiljević, M., Farkaš, H., Raj, J., Tolimir, N., Radulović, S., Nešić, V., i Trailović, J. N. (2023). Evaluation of effectiveness of a novel multicomponent mycotoxins detoxification agent in the presence of AFB1 and T-2 toxin on broiler chicks. *Microorganisms*, 11(3), 574.
215. Stefanović, S. (2014). Uopredno ispitivanje prisustva aflatoksina B1 u hrani za životinje i aflatoksina M1 u mleku. Универзитет у Београду.



216. Stoev, S., Diakov, L., Koynarski, V., i Angelov, A. (2010). Special pathology and diagnostics of mycoses, mycotoxicoses, parasitoses, intoxications and avitaminoses. Publishing House CD Contrast, 1-239.
217. Suneja, S., Wagle, D., i Ram, G. (1989). Effect of oral administration of T-2 toxin on glutathione shuttle enzymes, microsomal reductases and lipid peroxidation in rat liver. *Toxicon*, 27(9), 995-1001.
218. Swanson, S. P., Nicoletti, J., Rood Jr, H. D., Buck, W. B., Cote, L. M., i Yoshizawa, T. (1987). Metabolism of three trichothecene ycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 414, 335-342.
219. Swenson, D. H., Miller, E. C., i Miller, J. A. (1974). Aflatoxin B1-2, 3-oxide: evidence for its formation in rat liver in vivo and by human liver microsomes in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 60(3), 1036-1043.
220. Šefer, D., Nedeljković-Trailović, J.; Marković, R., Petrujkić, B., Radulović, S., Jovanović, D. (2022). *Praktikum iz ishrane*, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Centar za izdavačku delatnost i promet učila.
221. Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T., i Bailly, J. (2009). Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *Journal of food protection*, 72(3), 662-665.
222. Tedesco, D., Steidler, S., Galletti, S., Tameni, M., Sonzogni, O., i Ravarotto, L. (2004). Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poultry Science*, 83(11), 1839-1843.
223. Tessari, E. N. C., Oliveira, C. A. F. d., Cardoso, A., Ledoux, D., i Rottinghaus, G. (2006). Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *British Poultry Science*, 47(3), 357-364.
224. Thompson, W., i Wannemacher Jr, R. (1990). In vivo effects of T-2 mycotoxin on synthesis of proteins and DNA in rat tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 105(3), 483-491.
225. Tomasevic-Canovic, M., Dumic, M., Vukicevic, O., Masi, Z., Zurovac-Kuzman, O., i Dakovic, A. (1997). The adsorption of mycotoxins on modified clinoptilolite. *Natural Zeolites" Sofia Zeolite Meeting*,
226. Townsend, C. A., McGuire, S. M., Brobst, S. W., Graybill, T. L., Pal, K., i Barry, C. E. (1992). Examination of Tetrahydro- and Dihydrobisfuran Formation in Aflatoxin Biosynthesis: From Whole Cells to Purified Enzymes. In R. J. Petroski i S. P. McCormick (Eds.), *Secondary-Metabolite Biosynthesis and Metabolism* (pp. 141-154). Springer US.
227. Trucksess, M., Stoloff, L., Young, K., Wyatt, R., i Miller, B. (1983). Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poultry Science*, 62(11), 2176-2182.
228. Trusal, L. R., i O'Brien, J. C. (1986). Ultrastructural effects of T-2 mycotoxin on rat hepatocytes in vitro. *Toxicon*, 24(5), 481-488.
229. Tung, H., Wyatt, R., Thaxton, P., i Hamilton, P. (1975). Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 34(2), 320-326.
230. Ueno, Y. (1977). Mode of action of trichothecenes. *Pure and Applied Chemistry*, 49(11), 1737-1745.
231. Ueno, Y. (1983). General toxicity//Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. In: Amsterdam.
232. Ueno, Y., Kubota, K., Ito, T., i Nakamura, Y. (1978). Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Research*, 38(3), 536-542.
233. Van der Fels-Klerx, H., Adamse, P., Punt, A., i Van Asselt, E. D. (2018). Data analyses and modelling for risk based monitoring of mycotoxins in animal feed. *Toxins*, 10(2), 54.
234. Vedula, L. S., Zhao, Y., Coates, R. M., Koyama, T., Cane, D. E., i Christianson, D. W. (2007). Exploring biosynthetic diversity with trichodiene synthase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 466(2), 260-266.
235. Visconti, A., i Mirocha, C. J. (1985). Identification of various T-2 toxin metabolites in chicken excreta and tissues. *Applied and environmental microbiology*, 49(5), 1246-1250.

236. Wang, F., Zuo, Z., Chen, K., Gao, C., Yang, Z., Zhao, S., Li, J., Song, H., Peng, X., i Fang, J. (2018). Histopathological injuries, ultrastructural changes, and depressed TLR expression in the small intestine of broiler chickens with aflatoxin B1. *Toxins*, 10(4), 131.
237. Wei, J.-T., Wu, K.-T., Sun, H., Khalil, M. M., Dai, J.F., Liu, Y., Liu, Q., Zhang, N.Y., Qi, D.S., i Sun, L.H. (2019). A novel modified hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) adsorbent can effectively reduce T-2 toxin-induced toxicity in growth performance, nutrient digestibility, serum biochemistry, and small intestinal morphology in chicks. *Toxins*, 11(4), 199.
238. Weidenbörner, M. (2001). *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer Berlin Heidelberg. <https://books.google.rs/books?id=T9-g289BCeYC>
239. Weng, M.-W., Lee, H.-W., Choi, B., Wang, H.-T., Hu, Y., Mehta, M., Desai, D., Amin, S., Zheng, Y., i Tang, M.-S. (2017). AfB<sub>1</sub> hepatocarcinogenesis is via lipid peroxidation that inhibits DNA repair, sensitizes mutation susceptibility and induces aldehyde-DNA adducts at p53 mutational hotspot codon 249. *Oncotarget*, 8(11), 18213.
240. Widstrom, N. W. (1996). The aflatoxin problem with corn grain.
241. Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological reviews*, 30(2), 460-470.
242. Wolzak, A., Pearson, A., Coleman, T., Pestka, J., i Gray, J. (1985). Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 23(12), 1057-1061.
243. Wu Li, W. L., Li JianJun, L. J., Li Yunhu, L. Y., Li TieJun, L. T., He QingHua, H. Q., Tang YuLong, T. Y., Liu HongNan, L. H., Su YongTeng, S. Y., Yin YuLong, Y. Y., i Liao Peng, L. P. (2016). Aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from different Province in China.
244. Wu, Q., Dohnal, V., Kuca, K., i Yuan, Z. (2013). Trichothecenes: Structure-toxic activity relationships. *Current Drug Metabolism*, 14(6), 641-660.
245. Wu, Q., Engemann, A., Cramer, B., Welsch, T., Yuan, Z., i Humpf, H.-U. (2012). Intestinal metabolism of T-2 toxin in the pig cecum model. *Mycotoxin research*, 28, 191-198.
246. Xie, K., He, X., Hu, G., Zhang, H., Chen, Y., Hou, D.-X., i Song, Z. (2022). The preventive effect and mechanisms of adsorbent supplementation in low concentration aflatoxin B1 contaminated diet on subclinical symptom and histological lesions of broilers. *Poultry Science*, 101(3), 101634.
247. Yang, L., Tu, D., Wu, Y., Liu, W., Hu, Y., Liu, T., Tan, L., Li, Y., Lei, H., Zhan, Y., Wang, N., Deng., Z., Guo, S. i Wang, A. (2020). Distribution and persistence of residual T-2 and HT-2 toxins from moldy feed in broiler chickens. *Toxicon*, 178,82-91.
248. Yin, H., Han, S., Chen., Y., Wang, Y., Li, D. i Zhu, Q. (2020). T-2 toxin induces oxidative stress, apoptosis and cytoprotective autophagy in chicken hepatocytes. *Toxins*, 12(2),90.
249. Yoshizawa, T., Swanson, S., i Mirocha, C. (1980). In vitro metabolism of T-2 toxin in rats. *Applied and environmental microbiology*, 40(5), 901-906.
250. Yunus, A., Razzazi-Fazeli, E., i Böhm, J. (2011). Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues. *Toxins*, 3, 566-590.
251. Yunus, A. W., Razzazi-Fazeli, E., i Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins*, 3(6), 566-590.
252. Zhao, J., Shirley, R., Dibner, J., Uraizee, F., Officer, M., Kitchell, M., Vazquez-Anon, M., i Knight, C. (2010). Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 89(10), 2147-2156.

**Prilog 1.** Prosečne telesne mase brojlera po nedeljama ogleđa u g, mere varijacije

<b>Grupe</b>	<b>n</b>	<b>X</b>	<b>±</b>	<b>Sx</b>	<b>Sd</b>	<b>Cv</b>	<b>Iv</b>
<b><u>1. dan ogleđa</u></b>							
<b>E-I</b>	12	52,92		0,73	2,54	4,79	51,30-54,53
<b>E-II</b>	12	51,58		0,78	2,71	5,28	49,86-53,51
<b>E-III</b>	12	51,83		0,86	2,98	5,75	49,94-53,73
<b>E-IV</b>	12	51,58		0,68	2,35	4,56	50,09-53,08
<b>E-V</b>	12	51,58		0,78	2,71	5,26	49,86-53,31
<b>E-VI</b>	12	51,50		0,87	3,03	5,88	49,57-53,43
<b>K</b>	12	51,33		0,89	3,08	6,00	49,37-53,29
<b>MS</b>	12	51,33		0,69	2,38	4,65	49,82-52,85
<b><u>7. dan ogleđa</u></b>							
<b>E-I</b>	12	130,8		1,87	6,50	4,97	126,6-134,9

<b>E-II</b>	12	172,2	2,75	9,53	5,54	166,1-178,2
<b>E-III</b>	12	130,7	1,75	6,06	4,64	126,8-134,5
<b>E-IV</b>	12	167,8	2,16	7,47	4,45	163,0-172,5
<b>E-V</b>	12	121,7	2,03	7,05	5,79	117,2-126,1
<b>E-VI</b>	12	128,0	1,85	6,42	5,02	123,9-132,1
<b>K</b>	12	173,9	2,37	8,21	4,72	168,7-179,1
<b>MS</b>	12	176,9	2,58	8,95	4,90	176,9-188,3

**14. dan ogleda**

<b>E-I</b>	12	339,5	2,47	8,55	2,52	334,1-344,9
<b>E-II</b>	12	387,8	2,22	7,68	1,98	382,9-392,6
<b>E-III</b>	12	339,9	2,70	9,33	2,75	334,0-345,8
<b>E-IV</b>	12	386,7	2,23	7,75	2,00	381,7-391,6
<b>E-V</b>	12	316,9	1,61	5,58	1,76	313,4-320,5
<b>E-VI</b>	12	325,7	3,68	12,78	3,92	317,5-333,8
<b>K</b>	12	431,3	2,46	8,52	1,97	425,9-436,7

<b>21. dan ogleda</b>						
<b>E-I</b>	12	627,8	2,93	10,17	1,62	621,4-634,3
<b>E-II</b>	12	690,8	2,61	9,06	1,31	685,1-696,6
<b>E-III</b>	12	626,6	3,77	13,08	2,09	618,3-634,9
<b>E-IV</b>	12	688,4	2,71	9,40	1,37	682,4-694,4
<b>E-V</b>	12	589,8	4,35	15,09	2,56	580,2-599,3
<b>E-VI</b>	12	602,3	2,86	9,91	1,65	596,0-608,5
<b>K</b>	12	791,2	3,24	11,23	1,42	784,0-798,3
<b>MS</b>	12	831,4	2,50	8,69	1,05	825,9-836,9
<b>28. dan ogleda</b>						
<b>E-I</b>	12	935,8	3,08	10,67	1,14	929,0-942,5
<b>E-II</b>	12	1032	7,20	24,97	2,42	1016-1048
<b>E-III</b>	12	940,1	3,51	12,18	1,30	932,3-947,8
<b>E-IV</b>	12	1034	8,88	30,76	2,98	1014-1053
<b>E-V</b>	12	834,2	3,63	12,60	1,51	826,2-842,2
<b>E-VI</b>	12	869,3	3,34	11,59	1,33	862,0-876,7
<b>K</b>	12	1235	3,59	12,46	1,01	1227-1243
<b>MS</b>	12	1304	2,68	9,29	0,71	1298-1310
<b>35. dan ogleda</b>						
<b>E-I</b>	12	1326	7,53	26,08	1,97	1310-1343
<b>E-II</b>	12	1472	2,81	9,76	0,66	1466-1478
<b>E-III</b>	12	1326	8,96	31,05	2,34	1306-1346
<b>E-IV</b>	12	1472	3,57	12,38	0,84	1464-1480
<b>E-V</b>	12	1215	3,95	13,69	1,13	1207-1224
<b>E-VI</b>	12	1255	4,71	16,32	1,30	1245-1266
<b>42. dan ogleda</b>						
<b>E-I</b>	12	1826	12,6	43,80	2,40	1799-1854
<b>E-II</b>	12	2055	10,2	35,54	1,73	2032-2077
<b>E-III</b>	12	1828	13,3	46,12	2,52	1798-1857
<b>E-IV</b>	12	2054	7,98	27,65	1,35	2036-2071
<b>E-V</b>	12	1692	1,91	6,62	0,39	1688-1696
<b>E-VI</b>	12	1742	4,91	17,02	0,98	1731-1752
<b>K</b>	12	2336	7,35	25,48	1,09	2320-2352
<b>MS</b>	12	2542	9,36	32,44	1,28	2521-2562

<b>Grupe</b>	<b>n</b>	<b>X</b>	<b>±</b>	<b>Sx</b>	<b>Sd</b>	<b>Cv</b>	<b>Iv</b>
<b><u>7. dan ogleda</u></b>							
<b>E-I</b>	12	77,83		2,14	7,42	9,53	73,12-82,55
<b>E-II</b>	12	120,6		3,41	11,84	9,82	113,1-128,1
<b>E-III</b>	12	78,83		1,85	6,43	8,16	74,74-82,92
<b>E-IV</b>	12	116,2		2,61	9,05	7,79	110,4-121,9
<b>E-V</b>	12	71,00		3,01	10,44	14,70	64,37-77,73
<b>E-VI</b>	12	76,50		1,66	5,77	7,55	72,83-80,17
<b>K</b>	12	122,6		2,38	8,27	6,75	117,3-127,8
<b>MS</b>	12	131,3		2,87	9,94	7,58	124,9-137,6
<b><u>14. dan ogleda</u></b>							
<b>E-I</b>	12	208,8		1,33	4,61	2,21	205,8-211,7
<b>E-II</b>	12	215,6		2,84	9,86	4,58	209,3-221,9
<b>E-III</b>	12	209,3		3,00	10,39	4,97	202,6-215,9
<b>E-IV</b>	12	218,9		2,63	9,12	4,17	213,1-224,7
<b>E-V</b>	12	194,3		3,04	10,55	5,43	187,6-201,0
<b>E-VI</b>	12	197,7		4,34	15,06	7,62	188,1-207,2
<b>K</b>	12	257,4		3,98	13,82	5,37	248,6-266,2
<b>MS</b>	12	275,8		4,30	14,91	4,41	266,4-285,3
<b><u>21. dan ogleda</u></b>							
<b>E-I</b>	12	288,3		2,98	10,35	3,59	281,8-294,9
<b>E-II</b>	12	303,1		2,36	8,19	2,70	297,9-308,3
<b>E-III</b>	12	286,7		4,80	16,64	5,80	276,1-297,2
<b>E-IV</b>	12	301,8		4,08	14,16	4,69	292,8-310,7
<b>E-V</b>	12	272,8		4,79	16,60	6,08	262,3-283,4
<b>E-VI</b>	12	276,6		5,23	18,15	6,56	265,1-288,1
<b>K</b>	12	359,8		3,86	13,37	3,72	351,3-368,3

<b><u>28. dan ogleda</u></b>						
<b>E-I</b>	12	305,4	4,00	13,87	4,54	296,6-314,2
<b>E-II</b>	12	341,1	6,58	22,80	6,68	326,6-355,6
<b>E-III</b>	12	313,5	6,28	21,76	6,94	299,7-327,3
<b>E-IV</b>	12	345,1	10,01	34,67	10,05	323,1-367,1
<b>E-V</b>	12	244,4	5,63	19,52	7,99	232,0-256,8
<b>E-VI</b>	12	267,1	4,19	14,53	5,44	257,9-276,3
<b>K</b>	12	443,8	4,69	16,25	3,66	433,4-454,1
<b>MS</b>	12	472,3	3,75	12,99	2,75	464,0-480,5
<b><u>35. dan ogleda</u></b>						
<b>E-I</b>	12	390,3	7,32	25,39	6,50	374,2-406,5
<b>E-II</b>	12	439,9	7,34	25,45	5,79	423,7-456,1
<b>E-III</b>	12	385,9	11,20	38,81	10,06	361,3-410,6
<b>E-IV</b>	12	438,4	10,27	35,56	8,11	415,8-461,0
<b>E-V</b>	12	381,1	6,06	21,01	5,51	367,7-394,4
<b>E-VI</b>	12	386,0	4,70	16,29	4,22	375,6-396,4
<b>K</b>	12	572,8	9,83	34,08	5,95	551,1-594,4
<b>MS</b>	12	594,7	4,69	16,27	2,74	584,3-605,0
<b><u>42. dan ogleda</u></b>						
<b>E-I</b>	12	500,3	15,22	52,72	10,54	466,8-533,8
<b>E-II</b>	12	583,1	11,00	38,12	6,54	558,9-607,3
<b>E-III</b>	12	501,7	14,68	50,85	10,14	469,4-534,0
<b>E-IV</b>	12	581,8	9,27	32,13	5,52	561,4-602,2
<b>E-V</b>	12	476,8	3,64	12,63	2,65	468,7-484,8
<b>E-VI</b>	12	486,2	8,51	29,50	6,07	467,4-504,9
<b>K</b>	12	528,6	12,45	43,14	8,16	501,2-556,0
<b>MS</b>	12	643,4	8,48	29,43	4,57	624,7-662,1

<b>1-42. dan ogleda</b>						
<b>E-I</b>	12	147,6	0,99	3,43	2,32	143,3-153,7
<b>E-II</b>	12	167,0	0,85	2,97	1,77	161,2-170,3
<b>E-III</b>	12	148,0	1,12	3,88	2,62	143,3-154,3
<b>E-IV</b>	12	166,8	0,68	2,37	1,42	161,8-169,9
<b>E-V</b>	12	137,1	0,43	1,51	1,10	135,9-141,7
<b>E-VI</b>	12	140,9	0,42	1,48	1,05	137,2-143,5
<b>K</b>	12	190,4	0,61	2,12	1,11	186,5-192,5
<b>MS</b>	12	207,5	0,80	2,79	1,34	203,1-211,8

**Prilog 3.** Statistička procena razlika telesnih masa brojlera tokom ogleda

<b>Izvori varijacija</b>	<b>Suma Kvadrata</b>	<b>d.f.</b>	<b>Srednji kvadrat</b>	<b>F-vrednost</b>	
<b><u>1. dan</u></b>					
Između grupa	22,17	7	3,167	0,4224	
Unutar grupa	659,7	88	7,496		
ukupno	681,8	95			
<b><u>7. dan</u></b>					
Između grupa	53570	7	7653	131,9	***
Unutar grupa	5105	88	58,02		
ukupno	58680	95			
<b><u>14. dan</u></b>					
Između grupa	224500	7	32070	403,6	***
Unutar grupa	6992	88	79,45		
ukupno	231500	95			
<b><u>21. dan</u></b>					
Između grupa	662800	7	94680	778,7	***
Unutar grupa	10700	88	121,6		
ukupno	673500	95			
<b><u>28. dan</u></b>					
Između grupa	2372006	7	338797	1145	***
Unutar grupa	26035	88	295,9		
ukupno	2398006	95			
<b><u>35. dan</u></b>					
Između grupa	5399006	7	771263	1822	***
Unutar grupa	37248	88	423,3		
ukupno	5436006	95			
<b><u>42. dan</u></b>					



Između grupa	7599006	7	1086006	1071	***
Unutar grupa	89190	88	1014		
ukupno	7689006	95			

#### Prilog 4. Statistička procena razlika TM brojlera tokom oglada

grupe	n	E-VI	E-V	E-IV	E-III	E-II	E-I	K	MR
<b>1. dan</b>									
E-I	12	1,79	1,68	1,68	1,37	1,37	-	2,00	2,00
E-II	12	0,10	0,00	0,00	0,31	-	-	0,31	0,31
E-III	12	0,42	0,31	0,31	-	-	-	0,63	0,63
E-IV	12	0,10	0,00	-	-	-	-	0,31	0,31
E-V	12	0,10	-	-	-	-	-	0,31	0,31
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	0,21	0,21
K	12	-	-	-	-	-	-	-	0,00
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>7. dan</b>									
E-I	12	1,25	4,13	16,83***	0,03	18,84***	-	19,63***	23,57***
E-II	12	20,09***	22,97***	2,00	18,87***	-	-	0,79	4,73*
E-III	12	1,21	4,093	16,87***	-	-	-	19,67***	23,61***
E-IV	12	18,08***	20,96***	-	-	-	-	2,80	6,74***
E-V	12	2,88	-	-	-	-	-	23,76***	27,70***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	20,88***	24,82***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	3,94
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>14. dan</b>									
E-I	12	5,37**	8,77***	18,33***	0,16	18,75***	-	35,69***	46,21***
E-II	12	24,13***	27,53***	0,42	18,59***	-	-	16,94***	27,46***
E-III	12	5,53**	8,93***	18,17***	-	-	-	35,53***	46,05***
E-IV	12	23,71**	27,11***	-	-	-	-	17,36***	27,88***
E-V	12	3,40	-	-	-	-	-	44,47***	54,99***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	41,06***	51,59***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	10,53***
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>21. dan</b>									
E-I	12	8,03***	11,96***	19,03***	0,39	19,79***	-	51,31***	63,96***
E-II	12	27,83***	31,76***	0,75	20,18***	-	-	31,52***	44,16***
E-III	12	7,64***	11,57***	19,42***	-	-	-	51,70***	64,35***
E-IV	12	27,07***	31,00***	-	-	-	-	32,28***	44,92***
E-V	12	3,92	-	-	-	-	-	63,27***	75,92***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	59,35***	71,99***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	12,64***
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>28. dan</b>									
E-I	12	13,49***	20,63***	19,85***	0,87	19,53***	-	60,75***	74,71***
E-II	12	33,01***	40,16***	0,32	18,65***	-	-	41,22***	55,18***
E-III	12	14,37***	21,51***	18,97***	-	-	-	59,87***	73,83***
E-IV	12	33,34***	40,48***	-	-	-	-	40,90***	54,86***
E-V	12	7,14***	-	-	-	-	-	81,38***	95,34***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	74,24***	88,20***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	13,96***
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>35. dan</b>									
<b>E-I</b>	12	11,91***	18,66***	24,55***	0,01	24,54***	-	81,09***	96,35***
<b>E-II</b>	12	36,45***	43,20***	0,01	24,55***	-	-	56,55***	71,81***
<b>E-III</b>	12	11,90***	18,65***	24,57***	-	-	-	81,10***	96,37***
<b>E-IV</b>	12	36,47***	43,22***	-	-	-	-	56,53***	71,80***
<b>E-V</b>	12	6,74***	-	-	-	-	-	99,75***	115,0***
<b>E-VI</b>	12	-	-	-	-	-	-	93,00***	108,3***
<b>K</b>	12	-	-	-	-	-	-	-	15,27***
<b>MR</b>	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>42. dan</b>									
<b>E-I</b>	12	9,24***	14,63***	24,74***	0,13	24,86***	-	55,48***	77,84***
<b>E-II</b>	12	34,10***	33,49***	0,12	24,73***	-	-	30,61***	52,97***
<b>E-III</b>	12	9,37***	14,76***	24,60***	-	-	-	55,34***	77,70***
<b>E-IV</b>	12	33,98***	39,36***	-	-	-	-	30,74***	53,10***
<b>E-V</b>	12	5,38**	-	-	-	-	-	70,10***	92,46***
<b>E-VI</b>	12	-	-	-	-	-	-	64,72***	87,08***
<b>K</b>	12	-	-	-	-	-	-	-	22,36***
<b>MR</b>	12	-	-	-	-	-	-	-	-

### Prilog 5. Statistička procena razlika prirasta brojlera tokom oglada

Izvori varijacija	Suma Kvadrata	d.f.	Srednji kvadrat	F-vrednost
<b>7. dan</b>				
Između grupa	54010	7	7716	98,26 ***
Unutar grupa	6910	88	78,52	
ukupno	60920	95		
<b>14. dan</b>				
Između grupa	70780	7	10110	76,22 ***
Unutar grupa	11670	88	132,7	
ukupno	82450	95		
<b>21. dan</b>				
Između grupa	120500	7	17210	85,20 ***
Unutar grupa	17780	88	202,0	
ukupno	138300	95		
<b>28. dan</b>				
Između grupa	535400	7	76480	179,3 ***
Unutar grupa	37530	88	426,5	
ukupno	572900	95		
<b>35. dan</b>				
Između grupa	632800	7	90390	116,7 ***
Unutar grupa	68160	88	774,5	
ukupno	700900	95		
<b>42. dan</b>				

Između grupa	292000	7	41710	28,75	***
Unutar grupa	127700	88	1451		
ukupno	419700	95			
<b><u>1-42. dan</u></b>					
Između grupa	52667	7	7524	7,88	***
Unutar grupa	640	88	7,28		
ukupno	53307	95			

**Prilog 6.** Statistička procena razlika prirasta brojlera tokom ogleda

grupe	n	E-VI	E-V	E-IV	E-III	E-II	E-I	K	MR
<b>7. dan</b>									
E-I	12	0,52	2,67	14,99***	0,39	16,71***	-	17,49***	20,88***
E-II	12	17,23***	19,38***	1,72	16,32***	-	-	0,78	4,17
E-III	12	0,91	3,06	14,59***	-	-	-	17,10***	20,49***
E-IV	12	15,51***	17,66***	-	-	-	-	2,50	5,86**
E-V	12	2,15	-	-	-	-	-	20,17***	23,55***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	18,02***	21,40***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	3,38
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>14. dan</b>									
E-I	12	3,33	4,33	3,05	0,15	2,05	-	14,64***	20,18***
E-II	12	5,38**	6,39***	1,00	1,90	-	-	12,58***	18,12***
E-III	12	3,48	4,48*	2,90	-	-	-	14,49***	20,03***
E-IV	12	6,39	7,39***	-	-	-	-	11,58***	17,12***
E-V	12	1,00	-	-	-	-	-	18,97***	24,51***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	17,97***	23,51***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	5,53**
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>21. dan</b>									
E-I	12	2,86	3,77	3,27	0,40	3,59	-	17,43***	20,64***
E-II	12	6,45***	7,37***	0,32	4,00	-	-	13,83***	17,04***
E-III	12	2,45	3,37	3,67	-	-	-	17,83***	21,04***
E-IV	12	6,13**	7,04***	-	-	-	-	14,16***	17,37***
E-V	12	0,91	-	-	-	-	-	21,20***	24,41***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	20,29***	23,50***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	3,20
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>28. dan</b>									
E-I	12	6,43***	10,23***	6,65***	1,35	5,98**	-	23,20***	27,98***
E-II	12	12,41***	16,21***	0,67	4,62*	-	-	17,22***	22,00***
E-III	12	7,78***	11,59***	5,29**	-	-	-	21,85***	26,63***
E-IV	12	13,08***	16,89***	-	-	-	-	16,55***	21,33***
E-V	12	3,80	-	-	-	-	-	33,43***	38,22***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	29,63***	34,41***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	4,78*
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>35. dan</b>									
E-I	12	0,53	1,15	5,98**	0,54	6,17***	-	22,71***	25,43***
E-II	12	6,71***	7,32***	0,18	6,72***	-	-	16,53***	19,26***
E-III	12	0,01	0,60	6,53***	-	-	-	23,26***	25,98***
E-IV	12	6,52***	7,13***	-	-	-	-	16,72***	19,45***
E-V	12	0,61	-	-	-	-	-	23,86***	26,59***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	23,25***	25,97***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	2,72
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>42. dan</b>									
E-I	12	1,28	2,14	7,41***	0,12	7,52***	-	2,59	13,08***
E-II	12	8,81***	9,67***	0,11	7,40***	-	-	4,95*	5,48**
E-III	12	1,41	2,26	7,29***	-	-	-	2,55	12,89***
E-IV	12	8,70***	9,55***	-	-	-	-	4,84*	5,60**
E-V	12	0,85	-	-	-	-	-	4,71*	15,16***
E-VI	12	-	-	-	-	-	-	3,85	14,30***
K	12	-	-	-	-	-	-	-	10,44***
MR	12	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>1-42. dan</b>									
<b>E-I</b>	12	8.625***	13.42***	24.74***	0.51	24.89***	-	55.05***	76.99***
<b>E-II</b>	12	33.52***	28.32***	0.154	24.39***	-	-	30.16***	52.10***
<b>E-III</b>	12	9.13***	13.93***	24.23***	-	-	-	54.54***	76.49***
<b>E-IV</b>	12	33.36***	38.16***	-	-	-	-	30.31***	52.25***
<b>E-V</b>	12	4.80*	-	-	-	-	-	68.42***	90.42***
<b>E-VI</b>	12	-	-	-	-	-	-	63.67***	85.62***
<b>K</b>	12	-	-	-	-	-	-	-	21.94***
<b>MR</b>	12	-	-	-	-	-	-	-	-

**Prilog 7.** Statistička procena razlika prisustva rezidua AfB<sub>1</sub> (u µg/kg) u jetri brojlera

<b>Grupe</b>	<b>n</b>	<b>X</b>	<b>±</b>	<b>Sx</b>	<b>Sd</b>	<b>Cv</b>	<b>Iv</b>
<b>E-I</b>	6	0,2352		0,0033	0,0082	3,50	0,2216-0,2487
<b>E-II</b>	6	0,1228		0,0016	0,0040	3,31	0,1161-0,1295

**Prilog 8.** Statistička procena razlika prisustva rezidua AfB<sub>1</sub> (u µg/kg) u jetri brojlera

<b>Izvori varijacija</b>	<b>Suma Kvadrata</b>	<b>d.f.</b>	<b>Srednji kvadrat</b>	<b>F-vrednost</b>
<b>42. dan</b>				
Između grupa	2,734	2	1,367	48630***
Unutar grupa	0,0004	15	0,000028	
ukupno	2,734	17		

**Prilog 9.** Statistička procena razlika prisustva rezidua AfB<sub>1</sub> (u µg/kg) u jetri brojlera

<b>Grupe</b>	<b>n</b>	<b>E-II</b>	<b>K</b>	<b>E-I</b>
<b>E-I</b>	12	51,90***	353,33***	-
<b>E-II</b>	12	-	405,2***	-

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани Дарко Стефановић

број уписа 2014/5016

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање ефикасности вишекомпонентног препарата за детоксикацију у превенирању штетних ефеката афлатоксина Б1 и Т-2 токсина додатих у храну бројлера

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 03.12.2024.

---

## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дарко Стефановић

Број уписа 2014/5016

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада Испитивање ефикасности вишекомпонентног препарата за детоксикацију у превенирању штетних ефеката афлатоксина Б1 и Т-2 токсина додатих у храну бројлера

Ментор Др Јелена Недељковић Траиловић, ментор 1, редовни професор

Др Мирјана Миловновић, ментор 2, ванредни професор

Потписани Дарко Стефановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 03.12.2024.

---

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање ефикасности вишекомпонентног препарата за детоксикацију у превенирању штетних ефеката афлатоксина Б1 и Т-2 токсина додатих у храну бројлера

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 03.12.2024.

---

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.



2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.