Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr n. wet. Kazimierz Jan Obremski

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2015

1. **Imię i nazwisko:**

   Kazimierz Jan Obremski

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej**

   - **1992** – tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Weterynaryjny, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie.
   - **1997** – dyplom ukończenia Studium Doskonalenia Pedagogicznego dla Nauczycieli Akademickich, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie.
   - **2000** – tytuł: Specjalista Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Puławy.
   - **2001** – stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Próba doświadczalnego ustalenia wartości diagnostycznych poziomów zearalenonu i jego metabolitów we krwi loszek".
   - **2003** – Studia podyplomowe w zakresie Analityka w Ochronie Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

   - **1995 - 1999** Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, asystent.
   - **1999 - 2003** Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent.
   - **2003 - 2004** Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent.
   - **2004 - 2008** Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt
   - **2008 do dnia dzisiejszego** Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt.

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zmianami)**

a) <u>tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego</u>

Jednotematyczny cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem**:** **„Badania nad wpływem zearalenonu na subpopulacje limfocytów Th i Ts/Tc oraz produkowane przez nie cytokiny w jelicie cienkim świni”.**

b) <u>autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:</u>

1. **Obremski K:** Changes in Th1 and Th2 cytokines concentrations in ileal Peyer’s patches in gilts exposed to zearalenone. Pol J Vet Sci, 2014, 1 (1), 53-59. **IF_{2014} = 0,604; punktacja $MNiSW_{2014}$ = 20; WoS_{CC} = 7**

   Wkład w autorstwo publikacji:

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), wykonaniu wszystkich badań laboratoryjnych, analizie statystycznej uzyskanych wyników i ich interpretacji, przygotowaniu tabeli i rycin, napisaniu publikacji i jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

2. **Obremski K:** The effect of in vivo exposure to zearalenone on cytokine secretion by Th1 and Th2 lymphocytes in porcine Peyer’s patches after in vitro stimulation with LPS. Pol J Vet Sci, 2014, 17 (4), 625–632. **IF_{2014} = 0,604; punktacja $MNiSW_{2014}$ = 20; WoS_{CC} = 1**

   Wkład w autorstwo publikacji:

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), wykonaniu wszystkich badań laboratoryjnych, analizie statystycznej uzyskanych wyników i ich interpretacji, przygotowaniu tabeli i rycin, napisaniu publikacji i jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

3. **Obremski K*,** Poniatowska-Broniek G.: Zearalenone induces apoptosis and inhibits proliferation in porcine ileal Peyer’s patches lymphocytes. Pol J Vet Sci, 2015, 18 (1), 153–161. **IF_{2014} = 0,604; punktacja $MNiSW_{2014}$ = 20; WoS = 1**

   Wkład w autorstwo publikacji:

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), wykonaniu części badań laboratoryjnych, analizie statystycznej uzyskanych wyników i ich interpretacji, przygotowaniu tabel i rycin, napisaniu publikacji i jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4. **Obremski K*,** Gonkowski S, Wojtacha P: Zearalenone - induced changes in lymphoid tissue and mucosal nerve fibers in the porcine ileum. Pol J Vet Sci, 2015, 18 (2), 357–365. **IF_{2014} = 0,604; punktacja $MNiSW_{2014}$ = 20; WoS = 0**

   Wkład w autorstwo publikacji:

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), wykonaniu części badań laboratoryjnych, analizy statystycznej uzyskanych wyników i ich interpretacji, przygotowanie rycin, napisaniu publikacji i jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

5. **Obremski K*,** Wojtacha P, Podlasz P, Żmigrodzka M: The influence of experimental administration of low zearalenone doses on the expression of Th1 and Th2 cytokines and on selected subpopulations of lymphocytes in intestinal lymph nodes. Pol J Vet Sci, 2015, 18 (3), 489–497. **IF_{2014} = 0,604; punktacja $MNiSW_{2014}$ = 20; WoS = 0**

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), wykonaniu części badań laboratoryjnych, analizie statystycznej uzyskanych wyników i ich interpretacji, przygotowanie tabeli i rycin, napisaniu publikacji i jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Łączna punktacja 5 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji wynosi:

- wg listy czasopism punktowanych **$MNiSW_{2014}$ = 100 pkt.**
- łączna wartość wskaźnika *Impact Factor* (**IF**) = **3,02**

Badania finansowane były z projektu badawczego własnego (N N308 237936) „Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świni” przyznanego przez MNiSW (w latach 2009-2012), kierownik dr n. wet. Kazimierz Jan Obremski.

Legenda:

WoS = 0 - prace, które są indeksowane w bazie Web of Science (Search), ale nie są cytowane

WoS_{CC} = liczba cytowań w bazie Web of Science Core Collection

Punktacja czasopism:

MNiSW - punkty z listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w dolnym indeksie podano rok)

IF = *Impact Factor* z bazy Journal Citation Reports (JCR): w dolnym indeksie podano rok
* - autor korespondencyjny

c) <u>omówienie celu naukowego ww. prac, osiągniętych wyników, znaczenia przeprowadzonych badań:</u>

WSTĘP

Mikotoksyny to toksyczne substancje chemiczne wytwarzane przez niektóre gatunki grzybów pleśniowych, które rozwijają się w produktach żywnościowych oraz zbożach. Termin „mikotoksyny" pochodzi od słów: greckiego „mycos" – grzyb oraz łacińskiego „toxicum" – trucizna. Są to strukturalnie niepowiązane wtórne metabolity produkowane przez różne grzyby pleśniowe, należące głównie do *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium, Claviceps* i *Alternaria* (Van der Fels-Klerx i wsp. 2012, Marin i wsp. 2013, Müller i Korn 2013, Nordkvist i Häggblom 2014). Mikotoksyny mogą już powstawać podczas wzrostu roślin uprawnych na polach, w czasie zbiorów, transportu lub przechowywania w warunkach podwyższonej wilgotności i temperatury. Nie są do końca poznane przyczyny, dla których grzyb pleśniowy wytwarza wtórne metabolity. Jedną z nich może być niedopuszczenie do zastojów metabolicznych. Bardziej prawdopodobny jest stres środowiskowy, na który jest narażony, a wynikający najczęściej z konkurencji o składniki pokarmowe z innymi mikroorganizmami. W związku z tym produkcja mikotoksyn może stanowić swoisty mechanizm obronny (Fox i Howlett 2008). Wtórne metabolity grzybów pleśniowych wykazują szerokie spektrum szkodliwego oddziaływania na organizmy żywe, w tym zwierzęta hodowlane i człowieka. Mikotoksyny zaznaczyły swój ślad w historii, chociażby z tego powodu, że istnieją uzasadnione podejrzenia iż toksyny T-2 i HT-2 (grupa A trichotecenów) wchodziły w skład tzw. „żółtego deszczu w dżungli Laos", jaki został rozpylony z samolotów podczas działań wojennych w Wietnamie w latach 1975-1981. Prawdopodobnie słynna klątwa Tutenchamona, której skutki odczuli archeolodzy prowadzący badania w grobowcu Faraona w 1922 roku, była spowodowana właśnie inhalacyjnym narażeniem na mikotoksyny. Wnioskować można również to na podstawie doświadczeń polskich naukowców, którzy w roku 1973 otworzyli grób króla Kazimierza Jagiellończyka, po czym dochodziło do licznych zejść śmiertelnych osób w tym uczestniczących z powodu oddziaływania ochratoksyny A (OTA) i kwasu cyklopiazinikowego (CPA) produkowanego przez kropidlaka żółtego (*A. flavus*), czy *Penicyllium* sp.

Jak wcześniej wspomniano największe zagrożenia związane z mikotoksynami wynikają z możliwości tworzenia się ich już podczas wzrostu rośliny, gdzie wpływ ludzki na panujące warunki jest praktycznie zerowy (uwarunkowania klimatyczne: temperatura, wilgotność, opady atmosferyczne) (Paterson i Lima 2010), a oprócz tego mikotoksyny należą do substancji wybitnie opornych na podstawowe zabiegi stosowane w przemyśle spożywczym (Kostelanska i wsp. 2011), co zwiększa ryzyko zatrucia.

Mikotoksyny, których do tej pory odkryto około 400, są związkami szkodliwymi zarówno dla ludzi i zwierząt (Wild i Gong 2010, Reinhold i Reinhardt 2011, Berthiller i wsp. 2013, Murugesan i wsp. 2015), a narażenie na nie może odbywać się głównie poprzez dotyk, wdychanie lub połknięcie (Mazur i Kim 2006). Należy podkreślić, że niektóre pleśnie są zdolne produkować więcej niż jedną mikotoksynę, a poniektóre z nich są produkowane przez więcej niż jeden gatunek pleśni i w ten sposób wiele mikotoksyn często występuje jednocześnie w jednym produkcie. Taka sytuacja stwarza zagrożenie jednoczesnego działania wielu toksycznych związków. Do mikotoksyn zaliczamy: i) aflatoksyny (AFL), na przykład AFB1, ii) ochratoksyny, na przykład ochratoksyna A (OTA), iii) trichoteceny, na przykład deoksynivalenol (DON), toksyna T-2, iv) fumonizyny, na przykład FB1, v) patulina (PAT) i vi) zearalenon (ZEN) (Stoev 2013, Gallo i wsp. 2015, Heussner i Bingle 2015).

Zearalenon (ZEN) o nazwie systematycznej (3S, 11E-14,16-dihydroksy-3-metylo-3,4,5,6,9,10-heksahydro-1H-2-benzoksacyklotetradecin-1,7(8H)-dion z chemicznego punktu widzenia jest 14-członowym laktonem kwasu rezorcynowego. ZEN jest mikotoksyną wytwarzaną przez różne szczepy gatunku *Fusarium*, ale przede wszystkim przez *Fusarium graminearum* (Gibberella zeae). Do innych grzybów, które go produkują należą *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti* i *Fusarium verticillioides* (Habschied i wsp. 2011, Rodrigues i Naehrer 2013, Taranu i wsp. 2015). ZEN jest specyficznym hormonem kontrolującym rozmnażanie płciowe *Fusarium* spp. Po wcześniejszych doniesieniach o występowaniu u świń syndromu estrogenowego karmionych spleśniałą paszą (McErlean 1952, McNutt i wsp. 1928), Stob i wsp. (1962) wyizolowali z kukurydzy zanieczyszczonej *Fusarium* uterotropowy związek, który wydawał się być czynnikiem etiologicznym zespołu estrogenowego u świń. Ten sam związek wyizolował później Christensen i wsp. (1965) z kukurydzy inokulowanej izolatami *Fusarium*. Został nazwany F-2 i okazał się mieć działanie estrogenne na macicę niedojrzałych szczurów.

U zwierząt monogastrycznych metabolizm ZEN odbywa się w wątrobie i błonie śluzowej jelita, gdzie jest hydroksylowany do α- i β-zearalenolu (ZEL) (Nowak i wsp. 2015). ZEN, α-ZEL i β-ZEL są szybko wchłaniane (w mniej niż 30 min) z przewodu pokarmowego

do krwi. Metabolizm ZEN występuje również w erytrocytach krwi obwodowej i komórkach nabłonka jelitowego (Malekinejad i wsp. 2006, Dänicke i Winkler 2015). Po podaniu *per os* ZEN wykazuje bardzo niską ostrą toksyczność z wartością LD_{50} w zakresie miligramów na kg masy ciała (Gajęcka i wsp. 2012, Streit i wsp. 2012). We wcześniejszych badaniach własnych wykazano, że ZEN podany *per os* loszkom w dawce 400 μg kg^{-1} m.c. wywołuje zmiany w kryptach jelitowych w postaci wzrostu aktywności komórek kubkowych, infiltracji limfocytami i uwydatnieniu się komórek Panetha u podstawy krypt jelitowych (Obremski i wsp. 2005). Luongo i wsp. (2006) stwierdzili, że nagromadzenie α-ZEL w organizmie może hamować proliferację komórek przez uruchomienie mechanizmu apoptozy.

ZEN jest silnym estrogenem o aktywności hormonalnej większej niż większość innych naturalnie występujących niesterydowych estrogenów, takich jak izoflawony soi i koniczyny. Z tego też względu ZEN jest częściej nazywany mikoestrogenem niż mikotoksyną (Nakamura i Kadokawa 2015). Każdego roku na całym świecie zanieczyszczeniu mikotoksynami ulega żywność dla ludzi i pasza dla zwierząt (Zinedine 2007, Obremski i wsp. 2009, Brera i wsp. 2014). W wielu raportach wykazano występowanie wysokiego stężenia ZEN w zbożach i innych produktach spożywczych na całym świecie (Pleadin i wsp. 2012, Juan i wsp. 2013, Streit i wsp. 2013, Vidal i wsp. 2013). Z danych opublikowanych w 2014 roku przez Hueza i wsp. (2014) wynika, że ZEN w Europie był obecny w 32% z 5010 przebadanych próbek mieszanek zbożowych. Na obecność ZEN w chlebie, piwie czy paszach wpływa stabilność jego cząsteczki na warunki magazynowania/mielenia i przetwarzania/gotowania (Cheli i wsp. 2013, Kim i wsp. 2013, Heidari i wsp. 2014, Yoshinari i wsp. 2014).

Od 2006 roku w krajach Unii Europejskiej obowiązuje zalecenie sugerujące dopuszczalne limity mikotoksyn w paszach dla poszczególnych gatunków zwierząt. Zgodnie z tą rekomendacją w paszach dla świń ZEN nie może przekraczać 250 μg kg^{-1} paszy. Dla loch i prosiąt jest dodatkowe ograniczenie wynoszące 100 μg kg^{-1} paszy (European Commission, Commission Recommendation 2006). Komitet ekspertów ds. dodatków do żywności (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) przyjął, że dla układu rozrodczego świń najwyższa dawka ZEN, która nie powoduje występowania szkodliwego efektu zdrowotnego (NOAEL) wynosi 40 μg kg^{-1} m.c. $dzień^{-1}$ (Eriksen i wsp. 2010), chociaż wcześniej niektórzy badacze sugerowali dawkę 10 μg kg^{-1} m.c. $dzień^{-1}$ (Bauer i wsp. 1987). Publikowane okresowo wyniki badań monitoringowych wskazują jednak na to, że średni poziom zanieczyszczenia paszy i/lub ziarna zbóż ZEN na świecie przekracza limity sugerowane przez Komisję UE (Kubizna i wsp. 2010).

Jak podają Avantaggiato i wsp. (2003) proces absorbcji ZEN odbywa się przede wszystkim w świetle jelit cienkich: w jelicie czczym (70-80%) i w jelicie krętym (30-15%). W związku z tym, jak również z powodu funkcjonującego u świń obiegu wątrobowo-jelitowego, ich układ pokarmowy jest bardzo silnie narażony na kontakt z ZEN. Mikotoksyna ta i jej metabolity zakłóca funkcje endokrynologiczne ssaków zarówno u samców, jak i samic różnych gatunków zwierząt (Jakimiuk i wsp. 2010). W licznych badaniach prowadzonych *in vivo* i *in vitro* wykazano, że ZEN wykazuje, przez obecność w swojej budowie chemicznej makrocyklicznego pierścienia laktonowego, aktywność i powinowactwo do obu receptorów estrogenowych (ERs): ERα i ERβ, występujących w tkankach ssaków (Golinski i wsp. 2009). Pomimo, że aktywność ZEN jest od 80 do 160 razy słabsza w porównaniu z 17-β-estradiolem to ZEN i niektóre z jego metabolitów z powodzeniem konkurują z tym hormonem, a utworzony odpowiedni kompleks wywołuje docelowy efekt hormonalny, aktywując transkrypcję genów wrażliwych na estrogeny (Turcotte i wsp. 2005, Jakimiuk i wsp. 2010, Döll i Dänicke 2011, Gajęcka i wsp. 2012).

U świń pozostających pod wpływem ZEN dochodzi do obrzęku macicy, tworzenia się torbieli jajnikowych i przyspieszania dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (Obremski i wsp. 2004, Fink-Gremmels i Malekinejad 2007, Obremski i wsp. 2008, Gajęcka i wsp. 2011). Stwierdzono, że stosunkowo niskie dawki ZEN (1,5 do 2 mg kg^{-1} diety) u niedojrzałych płciowo świń wywołują w przeciągu trzech do siedmiu dni obrzęk i pogrubienie ściany pochwy i sromu, wzrost masy macicy, atrofię jajników i nasiloną proliferację (Obremski i wsp. 2003a, Kanora i Maes 2009, Zielonka i wsp. 2009). Natomiast długotrwała ekspozycja na ZEN w zakresie dawek od 1 do 5 mg kg^{-1} paszy prowadzi do hyperestrogenizmu i zwiększonej śmiertelności świń. Dawki przekraczające 100 mg kg^{-1} paszy są przyczyną niepłodności loch (Zinedine i wsp. 2007, Kanora i Maes 2009). Ekspozycja świń na ZEN podczas ciąży i laktacji redukuje liczbę pęcherzyków jajnikowych u prosiąt w pokoleniu F1, co może prowadzić do przedwczesnego wyczerpania oocytów w wieku dorosłym (Schoevers i wsp. 2012).

Badania nad bezpośrednią immunotoksycznością ksenobiotyków obejmują pomiary masy i ocenę morfologii narządów limfatycznych. Innym istotnym aspektem jest określenie wpływu ksenobiotyków na funkcje immunologiczne, np. produkcję przeciwciał, proliferację limfocytów, produkcję cytokin i inne funkcje układu odpornościowego (De Jong i wsp. 2007, Paurene i Holland 2011). ZEN będący naturalnym związkiem ksenoestrogennym (mikoestrogenem) (Křivohlávková i wsp. 2013), podobnie do ksenobiotykow wpływa na budowę i funkcje narządów układu immunologicznego. Z jednej strony może prowadzić do

osłabienia odpowiedzi immunologicznej, a z drugiej do nadmiernego pobudzenia układu odpornościowego (Hueza i wsp. 2014). Możliwymi konsekwencjami tego typu działania jest obniżenie odporności i zwiększona wrażliwość na patogeny zakaźne, zwiększenie wrażliwości na wystąpienie nowotworów lub rozregulowanie odporności skutkujące alergią i chorobami autoimmunologicznymi (Gajęcki i wsp. 2006, Inadera 2006).

Układ odpornościowy związany z przewodem pokarmowym (GALT) jest największą i najbardziej skomplikowaną częścią ogólnego układu immunologicznego. Błony śluzowe przewodu pokarmowego są miejscem kontaktu organizmu ze środowiskiem zewnętrznym. Przyjmowany pokarm jest źródłem dużej liczby antygenów pokarmowych, szeregu mikroorganizmów, jak również opisywanych wcześniej mikotoksyn. Przyjmuje się, że poza błoną śluzową przewodu pokarmowego miejscami efektorowymi GALT są śródnabłonkowe limfocyty, a także zorganizowane struktury limfatyczne, do których zaliczamy kępki Peyera (Peyer's patches - PP), węzły chłonne, czy izolowane grudki chłonne. PP w przewodzie pokarmowym stanowią miejsce indukcji odpowiedzi immunologicznej głównie w jelicie krętym, czczym i dwunastnicy. Struktury te zbudowane są z grudek limfatycznych, czyli skupisk limfocytów B, znajdujących się pod blaszką mięśniową błony śluzowej, obszarów międzygrudkowych, składających się głównie z limfocytów T oraz kopuły wytworzonej z nabłonka towarzyszącego grudkom (FAE), w którym znajdują się komórki M. Z kolei węzły chłonne są elementem odporności przewodu pokarmowego i strukturami, które filtrują „płyny" dostające się do nich poprzez wychwytywanie i zatrzymywanie zarazków. Węzły chłonne biorą udział także w dojrzewaniu komórek układu odpornościowego oraz odpowiedzi immunologicznej (Gołąb i wsp. 2012).

Należy podkreślić, że stan wewnętrznej równowagi organizmu, utrzymywany jest dzięki współdziałaniu układu nerwowego, hormonalnego i immunologicznego. Zapewnia to odbieranie bodźców, zarówno ze środowiska zewnętrznego jak i wewnętrznego, ich przetwarzanie i wywoływanie odpowiedniej reakcji organizmu. Ta wysoce złożona współpraca między układowa uwarunkowana jest obecnością na komórkach układu immunologicznego szeregu receptorów dla neuroprzekaźników i hormonów. Unikatową cechą układu odpornościowego jest zdolność do rozróżniania tego, co własne od tego, co obce i możliwość czynnego reagowania odpowiedzią immunologiczną na infekcje wirusowe, bakteryjne, pierwotniacze, czy też własne zmienione patologicznie tkanki. Jednocześnie, komórki układu immunologicznego zapewniają nietykalność i ochronę własnym prawidłowym tkankom. Realizacja tych zadań możliwa jest dzięki współpracy grup komórek

immunokompetentnych, z których najważniejsze to limfocyty B, limfocyty T oraz komórki prezentujące antygen (APC).

Stan funkcjonalny układu odpornościowego, w tym GALT, zależy od sprawności wszystkich jego składowych oraz od ich podporządkowania komórce wykazującej wysoce istotną kompetencję immunologiczną, czyli limfocytowi T CD4+. Komórka ta jest odbiorcą informacji o stanie czynnościowym tkanek organizmu i przez syntezę i uwalnianie licznych cytokin, wykazuje zdolność pobudzenia lub hamowania funkcji innych komórek układu odpornościowego. Niedobór ilościowy i jakościowy tej populacji limfocytów T prowadzi wtórnie do dysfunkcji innych, podporządkowanych czynnościowo komórek immunologicznych. Może się to manifestować zwiększoną zapadalnością na infekcje, występowaniem chorób o podłożu autoimmunologicznym lub alergicznym, zaburzeń w układzie krwiotwórczym, czy też obniżeniem odporności przeciwnowotworowej. Jak wcześniej wspomniano, centralnymi komórkami odpowiedzi immunologicznej są limfocyty T $CD4^+$, które wywierają swój efekt na komórki docelowe zarówno przez uwalniane cytokiny, jak i na drodze bezpośredniego kontaktu. Pełnią funkcję indukcyjną (limfocyty pomocnicze, Th), tzn. zmuszają niejako komórki docelowe (efektorowe) do wypełniania ich programu genetycznego. Komórkami efektorowymi, które w mniejszym lub większym stopniu zależą od sygnałów indukujących limfocytów T $CD4^+$, są limfocyty B, inne subpopulacje limfocytów T, neutrofile, bazofile, eozynofile, monocyty, makrofagi oraz komórki biorące udział w hematopoezie. Populacja limfocytów T $CD4^+$ jest heterogenna i składa się z subpopulacji o zróżnicowanych funkcjach. Po różnicowaniu i migracji do obwodowych narządów układu odpornościowego, komórki T $CD4^+$ określane są jako komórki prekursorowe naiwne T i są funkcjonalnie niedojrzałe (Geginat i wsp. 2014, Niedźwiedzka-Rystwej i wsp. 2013, Schmitt i Ueno 2015).

Do populacji limfocytów T $CD4^+$, poza limfocytami pomocniczymi (Th), należą również limfocyty biorące udział w modulacji przebiegu odpowiedzi immunologicznej i są to limfocyty T regulacyjne (Treg). Wśród nich wyróżnia się trzy subpopulacje: naturalne Treg, indukowane komórki regulacyjne Tr1 (działają głównie za pośrednictwem interleukiny-10 (IL-10), ale również i transformującego czynnika wzrostu β (TGF-β)) i Th3 (działające za pośrednictwem TGF-β) (niekiedy używany jest termin „limfocyty T supresyjne" Ts) (Workman i wsp. 2009, Maślanka 2010, Wojas i Pajtasz-Piasecka 2010). Limfocyty Treg odgrywają ważną rolę w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej, prowadząc do wygaszania procesu zapalnego, poza tym stanowią kluczowy element utrzymania stanu tolerancji na antygeny własne gospodarza oraz kontroli zjawisk alergicznych i

autoimmunologicznych. Efektorowe komórki T CD4+ mogą dzielić się przynajmniej na cztery duże subpopulacje - Th1, Th2 (Jankovic i Feng CG 2015), Th9 (Ivanova i Orekhov 2015) i Th17 (Muranski i Restifo 2013), które są zależne od antygenów i mikrośrodowiska cytokinowego, które napotykają podczas aktywacji.

Limfocyty T $CD8^+$ są limfocytami cytotoksycznymi (Tc). Wyróżnia się dwie subpopulacje limfocytów T cytotoksycznych, Tc1 i Tc2, wytwarzające odpowiednio IFN-γ i IL-4 lub IL-5 (Mittrücker i wsp. 2014). Limfocyty Tc mają zdolność zabijania innych komórek, rozpoznając na ich powierzchni obcy antygen w kontekście MHC klasy I. Do populacji limfocytów T $CD8^+$ należą również limfocyty supresyjne (Ts) oraz regulacyjne, będące kolejną grupą komórek zaangażowanych w hamowanie odpowiedzi immunologicznej. Komórką docelową ich działania mogą być inne limfocyty T ($CD4^+$), limfocyty B, prawdopodobnie APC. Podjęcie przez limfocyty T $CD8^+$ zaprogramowanej funkcji wymaga w wielu przypadkach indukcji przez limfocyty T $CD4^+$.

Immunotoksyczne działanie mikotoksyn prowadzi do depresji aktywności limfocytów, hamowania wytwarzania przeciwciał, czy zakłócenia funkcji makrofagów i neutrofilii (Milićević i wsp. 2010). Wyniki badań nad oddziaływaniem fuzariotoksyn na układ immunologiczny wskazują, że powodują one zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją cytokin przez limfocyty pomocnicze Th1 i Th2 (Obremski i wsp. 2013). Jak wskazują wyniki niektórych badań, w obecności fumonizyny FB1 spada poziom IL-4 i wzrasta zdolność produkcji i uwalniania IFN-γ przez limfocyty T świń (Taranu i wsp. 2005). Z kolei niskie dawki toksyny T-2 stymulują produkcję IL-12, TNF-α, IFN-γ i IL-2 (Ahmadi i Riazipour 2008). Cytokiny uwalniane przez limfocyty Th2, zwłaszcza IL-4 i IL-10 spełniają ważną rolę w rozwoju swoistej odpowiedzi humoralnej. Wykazany niski surowiczy poziom IL-4 u zwierząt karmionych paszą zawierającą fumonizynę FB1 hamował rozwój swoistej odporności humoralnej. U samców prosiąt po spożyciu paszy zawierającej FB1 spadał w dużym zakresie surowiczy poziom swoistych przeciwciał po szczepieniu oraz zmniejszała się ekspresja mRNA dla IL-10. Oprócz posiadanych aktywności immnunosupresyjnych i prozapalnych DON, FB1, czy PAT mogą wpływać na równowagę populacji limfocytów pomocniczych Th1/Th2, której zmiana jest istotna w etiologii chorób przewodu pokarmowego takich jak IBD (inflammatory bowel disease), czy celiakia (Briani i wsp. 2008, Maresca i Fantini 2010, Fonseca-Camarillo i Yamamoto-Furusho 2015). Przykładowo DON podany myszom aktywował limfocyty Th2, a hamował odpowiedz immunologiczną Th1 (Li i wsp. 2005). Podobnie, ekspozycja ludzkich komórek mononuklearnych krwi obwodowej (PBMC) na PAT w dawkach subklinicznych, zmieniała równowagę pomiędzy odpowiedzią

immunologiczną Th1 i Th2 na rzecz odpowiedzi Th2, jak ma to miejsce w chorobach alergicznych i wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (Wichmann i wsp. 2002, Luft i wsp. 2008). W przeciwieństwie, traktowanie myszy FB1 powodowało odpowiedz immunologiczną Th1 (Bhandari i wsp. 2002). Interesujące obserwacje dotyczą AFL, które powodowały deplecję w licznych komórkach odpornościowych i immunosupresję nie zmieniając jednocześnie równowagi Th1/Th2 (Marin i wsp. 2002). Obecnie immunosupresyjny wpływ OTA i ZEN na równowagę komórek Th1/Th2 jest mało poznany (Sharma 1993, Al-Anati i Petzinger 2006). Możliwy wpływ ZEN na supresję odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu i szczepieniu zakaźnej i poszczepiennej sugerowali Kostro i wsp. (2011), wykazując u owiec karmionych paszą zanieczyszczoną ZEN znacznie zredukowany stosunek limfocytów TCD4+/TCD8+ w krwi obwodowej. Badania wpływu mikotoksyn na funkcje limfocytów PBMC u zwierząt i ludzi wykazały, że niektóre trichoteceny są zdolne do zakłócenia równowagi Th1/Th2. Szczególnie ma to miejsce w przypadku DON-u oddziałującego na limfocyty systemowe i kępek Peyera (Peyer's patches - PP) (Maoxiang i wsp. 2005).

Liczne dowody świadczą o istnieniu morfologicznych i funkcjonalnych relacji między układem odpornościowym i nerwowym. Układ nerwowy jelitowy (enteric nervous system - ENS) moduluje mechanizmy odpornościowe zaangażowane w ochronę błony śluzowej, jak i obronę całego organizmu. Neurony jelitowe unerwiają śluzówkę jelit, w tym również GALT. Unerwienie PP obejmuje włókna peptydoergiczne, które zawierają neuropeptydy m. in. takie, jak naczynioruchowy peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide - VIP), substancję P (Substance P - SP), czy peptyd zależny od genu kalcytoniny (calcitonin gene-related peptide - CGRP) (Gonkowski 2013, Bulc i wsp. 2015). Komórki immunologiczne posiadają ekspresję receptorów neuropeptydowych i ich aktywacja może wpływać na prezentację antygenów, produkcję cytokin i proliferację limfocytów. W związku z tym neuropeptydy stanowią potencjalny interfejs sygnalizacji między nerwami jelitowymi i komórkami odpornościowymi w PP. ENS może ulegać zmianom pod wpływem różnych bodźców fizjologicznych i patologicznych, takich jak starzenie się, dieta, procesy zapalne i inne choroby (Gonkowski i wsp. 2003, Vasina i wsp. 2006, Gonkowski i Całka 2012).

Działanie SP określanej mianem mitogenu w obrębie układu immunologicznego dotyczy jej wpływu na różnicowanie limfocytów B, wzrost uwalniania immunoglobulin, w szczególności IgA i wzmożoniu proliferacji limfocytów T w miejscach zmienionych zapalnie. Liczne badania przekonująco wykazały, że SP i jej neurokininowy receptor NK-1R odgrywają istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej i we wzmacnianiu reakcji zapalnej.

Jak podaje Weinstock (2015) SP moduluje proces zapalny i proliferację limfocytów, a unerwienie sympatyczne, jak również peptydergiczne jest zaangażowane w proces rozwoju i progresji wielu chorób autoimmunizacyjnych, zaburzeń alergicznych oraz zapalnych stanów bólowych. SP w stężeniach nanomolarnych skutecznie aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (nuclear factor kappa B - NF-κB), zaangażowany w kontrolę ekspresji cytokin (Marriott i wsp. 2000). Ponadto SP stymuluje komórki immunologiczne do produkcji cytokin zapalnych w tym IL-1, IL-6, IL-12 i czynnika martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor alpha - TNF-α) (Laurenzi i wsp. 1990, Weinstock 2015). Ekspresję SP i jej receptora NK-1R wykazano również na komórkach mikrogleju izolowanego z mózgu ludzkich płodów, komórkach macierzystych, ludzkich mononuklearnych fagocytach krwi obwodowej i limfocytach (Douglas i Leeman 2011, Feher i wsp. 2013). SP pochodzi z komórek T, makrofagów, komórek dendrytycznych i prawdopodobnie eozynofilii. Ten neutopeptyd reguluje produkcję IFN-γ w miejscach zapalenia, co wydaje się być mechanizmem działania w licznych stanach chorobowych. W nieswoistym zapaleniu jelit (IBD), klasyczne mediatory zapalne kierują komórkami T i makrofagami mającymi ekspresję SP i NK-1R. W ten sposób SP i NK-1R są częścią sieci regulacji immunologicznych i są integralnym komponentem niektórej odpowiedzi zapalnej (Weinstock 2015).

VIP jest z kolei neuropeptydem o działaniu antyzapalnym, hamującym aktywność limfocytów krwi obwodowej człowieka (Sirianni i wsp. 1992) oraz śledziony, węzłów chłonnych krezkowych i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej myszy (Yiangou i wsp. 1990, Ran i wsp. 2015). Stwierdzono, że VIP jest neuropeptydem obecnym i uwalnianym z zakończeń nerwów i komórek układu odpornościowego, szczególnie limfocytów Th2. Reguluje on ekspresję cząsteczek kostymulujących takich jak B7-2 i w ten sposób wpływa na przesuwanie równowagi Th1/Th2 w stronę odpowiedzi typu Th2 (Delgado i Ganea 2001, Jimeno i wsp. 2012). VIP wywiera działanie przeciwzapalne na komórki zaangażowane zarówno we wrodzoną, jak i nabytą odporność, a mechanizm tego działania opiera się na hamowaniu wytwarzania i uwalniania cytokin zapalnych i chemokin (Ganea i wsp. 2015).

W dostępnej literaturze, poza badaniami własnymi, brak jest doniesień opisujących wpływ mikotoksyn, a szczególnie ZEN na ekspresję neuropeptydów ENS i jego oddziaływania na GALT (Gonkowski i wsp. 2015, Obremski i Poniatowska-Broniek 2015a).

Powyższe dane stanowiły główne przesłanki zachęcające do wykonania badań nad oddziaływaniem niskiej, pozostającej poniżej wartości NOAEL dawki ZEN na wybrane elementy układu immunologicznego oraz nerwowego jelita świni.

CELE BADAWCZE

1. **Określenie** wpływu podawania *per os* niskiej dawki ZEN przez okres 14, 28 i 42 dni na kształtowanie się odsetka wybranych populacji limfocytów w kępkach Peyera jelita biodrowego i w węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych u świń.
2. **Zbadanie** wpływu 14, 28 i 42 dniowego oddziaływania niskiej dawki ZEN podawanej *per os* na ekspresję wydzielania cytokin limfocytów pomocniczych Th1 (IL-2, IFN-γ) i Th2 (IL-4, IL-10) oraz cytokin prozapalnych syntetyzowanych przez makrofagi/monocyty (IL-1β, IL-12/IL-23 p40) u świń.
3. **Określenie** odpowiedzi cytokinowej limfocytów kępek Peyera jelita biodrowego loszek w reakcji na mitogen (LPS) w warunkach *in vitro* po wcześniejszym 14, 28 i 42 dniowym podawaniu *per os* niskiej dawki ZEN.
4. **Określenie** wpływu ZEN na proces apoptozy i proliferacji limfocytów w centrach rozrodczych kępek Peyera jelita biodrowego u świń otrzymujących przez okres 14, 28 i 42 dni *per os* ZEN.
5. **Zbadanie** potencjalnych współzależności między niektórymi odpornościowymi i neuronalnymi elementami w kępkach Peyera jelita krętego u świń grupy kontrolnej i traktowanej ZEN.
6. **Określenie** stężenia ZEN i α-ZEL w wątrobie, kępkach Peyera jelita biodrowego i w węzłach biodrowo-okrężniczych po podawaniu *per os* ZEN w dawce poniżej wartości NOAEL przez okres 14, 28 i 42 dni.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia na zwierzętach przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych (Nr opinii Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach – 55/2008 z dnia 24 października 2006 roku).

Badania przeprowadzono na grupie 30 samic świni domowej, rasy wielka biała polska (WBP) w wieku ok. 2 miesięcy o średniej masie ciała 15-18 kg, pochodzących z fermy świń w Bałdach w woj. warmińsko-mazurskim. Zwierzęta utrzymywane w kojcach z wolnym dostępem do wody, karmiono standardową paszą wolną od mikotoksyn (OTA, DON, toksyny T-2 i ZEN). Zwierzęta podzielono na dwie grupy: Grupa C (n=15) – zwierzęta kontrolne,

którym podano paszę wolną od ZEN oraz Grupa E (n=15) – zwierzęta, którym podawano ZEN.

Eksperyment polegał na podawaniu ZEN w żelatynowych kapsułkach w dawce 8µg ZEN kg^{-1} m.c.. Stężenie to odpowiada dawce 100 µg ZEN kg^{-1} paszy $dzień^{-1}$, która jest dopuszczalnym poziomem ZEN w paszach przeznaczonych do żywienia loszek i jest poniżej wartości NOAEL). W 14., 28. i 42. dniu doświadczenia od pięciu losowo wybranych świń z każdej grupy, wprowadzonych w narkozę pentobarbitalową, pobierano próbki z kępek Peyera jelita biodrowego i węzłów chłonnych biodrowo-okrężniczych w celu wykonania oznaczeń.

Po wcześniejszym wyizolowaniu komórek metodą nacinania tkanki, płukania w PBS i wirowania, przygotowano zawiesiny o koncentracji komórek 10^6/µl. Odsetki poszczególnych populacji limfocytów B, B_1, T i NK oraz subpopulacji limfocytów T (CD4+CD8-, CD8+CD4-, CD4+CD8+ i T TCRγδ+) w próbkach kępek Peyera jelita biodrowego i węzłach biodrowo-okrężniczych zwierząt oznaczano metodą cytometrii przepływowej, przy użyciu przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami. Za marker komórek B przyjęto cząstkę CD21, komórek B_1 – CD5+CD8-, komórek T – CD2, komórek NK – CD5-CD8+ i komórek TCRγδ+ – CD5-TCR+. Oznaczenia cytometryczne wykonano na cytometrze FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). Analizy danych cytometrycznych dokonano w programie Cell QuestTM (Becton Dickinson).

Poziomy cytokin (IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-1β oraz IL-12/IL-23 p40) w homogenatach uzyskanych z próbek kępek Peyera jelita biodrowego i węzłów chłonnych biodrowo-okrężniczych oznaczono przy użyciu komercyjnych immunoenzymatycznych zestawów ELISA Quantikinie (R&D Systems), Invitrogen oraz Mabtech. Odczytu dokonano na czytniku absorbancji TECAN Infinite M200. Uzyskane wyniki były porównywane do zawartości białka w ekstrakcie i przedstawiano je w pg mg^{-1} białka, które oznaczono wg metody Bradford (Bradford 1976).

Do oceny proliferacji limfocytów B z kępek Peyera jelita biodrowego pod wpływem mitogenu - lipopolisacharydu (LPS) w hodowli *in vitro* po 72 godzinach użyto kolorymetrycznego testu redukcji MTT. W supernatancie znad 72-godzinnej hodowli stymulowanych LPS limfocytów oznaczano poziomy wybranych cytokin limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 (odpowiednio IL-2 i IFN-γ oraz IL-4 i IL-10). Poziomy cytokin w supernatancie z hodowli określano w testach ELISA (jak wyżej).

Profile apoptozy i proliferacji w centrach rozrodczych (GC - germinal centres) kępek Peyera jelita biodrowego zwierząt grupy kontrolnej i otrzymującej ZEN badano na skrawkach tkanek utrwalonych w zbuforowanej 10% formalinie. Skrawki tkankowe, grubości 5

mikrometrów, uprzednio zatapiane w parafinie, barwiono rutynowo metodą hematoksylina/eozyna (HE) i obserwowano pod mikroskopem świetlnym w powiększeniu 600×. Dla półilościowej oceny apoptozy (komórki wykazujące cechy morfologiczne charakterystyczne dla komórek apoptotycznych - kondensacja chromatyny, obecność ciałek apoptotycznych) i proliferacji (mitoza) użyto arbitralnej skali, gdzie (+) = 0 – 5 zmian; (++) = 6 – 10 zmian; (+++) = powyżej 10 zmian w GC IPP. Ponadto do oceny apoptozy i proliferacji użyto także badań immunohistochemicznych obliczając wskaźnik aktywnej kaspazy-3 (CCasp3) i proliferacji (IP) będące odsetkiem komórek wykazujących ekspresję CCasp3 oraz PCNA.

W badaniu *in vitro* wykorzystano pierwotne hodowle limfocytów wyizolowanych z kępek Peyera jelita biodrowego loszek grupy C. Do hodowli komórek dodano rozpuszczony w alkoholu etylowym ZEN w dawce 1µg ml^{-1} (Lioi i wsp. 2004) i inkubowano hodowle bez dodatkowej stymulacji przez 7 dni w temperaturze 37^0C w wilgotnej atmosferze wzbogaconej 5% CO_2. Po zlizowaniu hodowli, pomiaru powstałych mono- i oligonucleosomów (markery komórek apoptotycznych) dokonano testem immunoenzymatycznym (Cell Death Detection ELISA, Roche) wg zaleceń producenta. Apoptozę w grupie doświadczalnej wyrażono, jako procent grupy kontrolnej, którą przyjęto za 100%.

W badaniu potencjalnych współzależności między niektórymi odpornościowymi i neuronalnymi elementami w kępkach Peyera jelita krętego u kontrolnych i traktowanych zearalenonem świń, wykorzystano oznaczenia immunohistochemiczne włókien SP- i VIP-immunoreaktywnych w błonie śluzowej jelita biodrowego, oznaczanie SP i VIP metodą ELISA oraz metodą Dot-Blot, w której analiza uzyskanych wyników przebiegała wg zasady: im wyższe jest stężenie VIP lub SP, tym dłuższa seria rozcieńczeń próbki w postaci spotów dających widoczny sygnał barwny, a tym samym wyższe miano badanego antygenu. Wizualnie odczytywano rozcieńczenie próbki, które jako ostatnie na membranie dawało widoczny sygnał. Rozcieńczenie to wyrażano, jako ułamek dziesiętny i obliczano jego ujemny logarytm.

Poziomy ZEN i α-ZEL w kępkach Peyera jelita biodrowego, węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych i wątrobie oznaczano metodą HPLC (Obremski i wsp. 2003b)

Wyniki wszystkich badań przedstawiono jako wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) lub standardowy błąd średniej (SEM). Analizy statystycznej dokonano za pomocą jednoczynnikowej lub dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Uzyskane wyniki pomiarów opracowano za pomocą programów Excel (Microsoft, USA) oraz Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Do zbadania rozkładu populacji zastosowano test Kołmogorowa-

Smirnowa. Za statystycznie istotne uznano różnice przy $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ i $p < 0,0001$.

Szczegółowy opis metodyczny wykonywanych badań zamieszczono w publikacjach stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe autora (**publikacje nr 1-5** cyklu habilitacyjnego).

WYNIKI

Wpływ podawania *per os* niskiej dawki ZEN przez okres 14, 28 i 42 dni na kształtowanie się odsetka wybranych populacji limfocytów w kępkach Peyera jelita biodrowego i w węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych u świń

W izolatach komórkowych uzyskanych z kępek Peyera jelita biodrowego metodą cytometrii przepływowej określono procentowy udział subpopulacji limfocytów Th (pomocniczo/indukcyjnych) CD4+CD8-, limfocytów Ts/Tc (supresorowo/cytotoksycznych) CD8+CD4-, odgrywających główną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, komórek NK, będących istotnym składnikiem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, limfocytów B CD21+, limfocytów T podwójnie pozytywnych (pamięci) CD4+CD8+ i limfocytów B_1 (fenotyp CD5+CD8-). W poszczególnych terminach doświadczenia pomiędzy populacjami CD4+CD8-, CD4-CD8+ i B_1 grupy kontrolnej (E) i doświadczalnej (C) oraz wewnątrz grup nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic, ale co należy podkreślić, wartości procentowe komórek CD4+CD8- i CD4-CD8+ u świń grupy E we wszystkich terminach wykazywały wyższe wartości w porównaniu do grupy C. Populacja limfocytów B_1 grupy E wykazywała bardziej dynamiczny wzrost do 28. dnia doświadczenia w porównaniu do grupy C. Zbliżony układ zmian stwierdzono w odsetku populacji komórek pamięci T CD4+CD8+ obu grup z tym, że w grupie E w 28. dniu doświadczenia zanotowano statystycznie istotny wzrost w porównaniu z dniem 0. ($p < 0,05$). Na uwagę zasługują zmiany wśród komórek NK. W grupie C wartości ich odsetka wykazywały tendencję wzrostową, poza istotną statystycznie różnicą pomiędzy 0., a 14. dniem doświadczenia ($p < 0,05$). Z kolei odwrotny trend wystąpił w grupie E, gdzie w trakcie całego doświadczenia miał miejsce spadek ich wartości procentowych. Limfocyty B CD21+ grupy C wykazywały liniowy statystycznie istotny wzrost w trakcie całego doświadczenia. Jednak w grupie E obserwowano wyraźnie niższe odsetki komórek B CD21+ w porównaniu z grupą C, szczególnie statystycznie niższe wartości wystąpiły w 28. ($p < 0,05$) i 42. ($p < 0,001$) dniu badań.

W węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych analizowano rozkład procentowy populacji limfocytów T CD2+, pomocniczych limfocytów T CD4+CD8-, cytotoksycznych komórek T CD8+CD4-, komórek T TCRγδ+ oraz komórek B CD21+. W poszczególnych terminach doświadczenia pomiędzy komórkami CD2+, CD4+CD8-, CD8+CD4- i T TCRγδ+ grupy C i E nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Jednak odsetki komórek CD2+, CD4+CD8- pochodzące od zwierząt otrzymujących ZEN, wykazały liniowy spadek w odróżnieniu od subpopulacji komórek CD8+CD4- i TCRγδ+, których odsetek liniowo wzrastał. W trakcie całego doświadczenia limfocyty B CD21+ grupy C wykazywały liniowy wzrost, w odróżnieniu od zwierząt otrzymujących ZEN, gdzie wartości tych limfocytów malały. W grupie E, w porównaniu do grupy C, obserwowano wyraźnie niższe odsetki komórek B CD21+, a statystycznie niższe wartości odnotowano w 28 ($p < 0,05$) i 42 ($p < 0,0001$) dniu badań.

Szczegółowo zagadnienia te omówiono w **publikacji drugiej (Obremski 2014b)** i **piątej (Obremski i wsp. 2015c)** omawianego cyklu prac.

Wpływ 14, 28 i 42 dniowego oddziaływania niskiej dawki ZEN podawanej *per os* na ekspresję wydzielania cytokin limfocytów pomocniczych Th1 (IL-2, IFN-γ) i Th2 (IL-4, IL-10) oraz cytokin prozapalnych syntetyzowanych przez makrofagi/monocyty (IL-1β, IL-12/IL-23 p40) u świń

Analiza zmian tkankowego poziomu IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-1β i IL-12/IL-23 p40 w trakcie trwania doświadczenia wykazała rzeczywisty profil odpowiedzi immunologicznej zwierząt grupy kontrolnej i poddanej intoksykacji ZEN.

Do oceny wytwarzania cytokin wykorzystano metodę ELISA, dokonując pomiaru stężeń cytokin wyizolowanych z kępek Peyera w przeliczeniu na białko (pg mg^{-1}), które wcześniej oznaczono wg metody Bradford. W grupie E zaobserwowano zwiększone wydzielanie cytokin zarówno Th1, jak i Th2. ZEN powodował liniowy wzrost wytwarzania IL-4 ($40,32 \pm 1,55$ ng mg^{-1} – $137,60 \pm$ ng mg^{-1}). Wartości pomiędzy 14. a 42. dniem różniły się między sobą statystycznie wysoko istotnie ($p < 0,01$), natomiast pomiędzy 28. a 42. statystycznie istotnie ($p < 0,05$). W 42. dniu doświadczenia odnotowano wysoce istotny statystycznie wzrost stężenia IL-4 grupy E w stosunku do grupy C ($p < 0,01$). Stężenie IL-10 w grupie E wzrastało w sposób liniowy ($5,99 \pm 0,15$ ng mg^{-1} – $16,39 \pm 1,11$ ng mg^{-1}) i pomiędzy 14., a 28. dniem różniło się istotnie statystycznie ($p < 0,05$), natomiast pomiędzy

14, a 42 terminem badania wysoce istotnie statystycznie ($p < 0,01$). Zmiany stężeń cytokin limfocytów Th1 (IL-2 i IFN-γ) w grupie E wykazywały również tendencje wzrostową, ale bez różnic statystycznie istotnych.

Wydzielanie cytokin w węźle biodrowo-okrężniczym przedstawia także rzeczywisty profil odpowiedzi immunologicznej zwierząt poddanych działaniu ZEN i otrzymujących placebo. W grupie E zaobserwowano zwiększone wydzielanie cytokin przez komórki Th1. Stężenia IL-2, IL-12/IL-23 p40 i IFN-γ w 28 dniu doświadczenia (11,31 ± 1,85 ng mg^{-1}, 577,80 ± 33,59 ng mg^{-1}, 270,80 ± 56.92 ng mg^{-1} odpowiednio) były statystycznie istotnie wyższe ($p < 0,01$) od tych, które oznaczono w grupie C (3,31 ± 0,52 ng mg^{-1}, 294,50 ± 18,74 ng mg^{-1}, 76,28 ± 16,36 ng mg^{-1}, odpowiednio). Stężenia IFN-γ u świń poddanych działaniu ZEN w 14. i 28. doświadczenia różniły się między sobą istotnie statystycznie ($p < 0,05$). Poziom IL-2 w grupie otrzymującej placebo w 28. dniu wykazał istotny statystycznie spadek w stosunku do 14. i 42 dnia eksperymentu (odpowiednio, $p < 0,05$, $p < 0,01$). Poziom cytokin produkowanych przez limfocyty Th2 (IL-4 i IL-10) w grupie E cechowała nieistotna statystycznie tendencja wzrostowa. W 28. dniu eksperymentu stężenie IL-10 w grupie zwierząt intoksykowanych było statystycznie wyższe w porównaniu do grupy otrzymującej placebo ($p < 0,05$, 15,97 ± 1.02 ng mg^{-1}, 5,23 ± 0,66 ng mg^{-1}, odpowiednio). Ponadto w grupie C stężenie IL-10 w 28 dniu podawania ZEN było statystycznie istotnie niższe niż w dniu 42. ($p < 0,05$).

Podawanie świniom przez 42 dni ZEN doprowadziło do istotnego wzrostu stężenia IL-12/IL-23 p40 i IL-1β w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Stężenie IL-12/IL-23 p40 i IL-1β w grupie doświadczalnej było ponad 3 krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.

Szczegółowo zagadnienia te omówiono w **publikacji pierwszej (Obremski 2014a)**, **czwartej (Obremski i wsp. 2015b)** i **piątej (Obremski i wsp. 2015c)** omawianego cyklu prac.

Odpowiedz cytokinowa limfocytów kępek Peyera jelita biodrowego loszek w reakcji na mitogen (LPS) w warunkach *in vitro* po wcześniejszym 14, 28 i 42 dniowym podawaniu *per os* niskiej dawki ZEN

Wyniki pomiaru stężeń cytokin w mediach hodowlanych wykonano metodą ELISA. Stężenie IL-2 w grupie C mieściło się w zakresie wartości od 15,43 ± 8,81 pg ml^{-1} (dzień 0.) do 27,95 ± 3,23 pg ml^{-1} (dzień 14.), W 28. i 42. dniu stężenie IL-2 było poniżej progu

detekcji. W grupie E najniższe stężenie IL-2 zanotowano w 42. dniu (3,22 ± 0,43 pg ml^{-1}), a najwyższe w 14. (24,83 ± 5,49 pg ml^{-1}). ZEN w wyraźny sposób zmniejszył reakcję na mitogen, co objawiło się spadkiem wydzielania IL-2 po stymulacji LPS w 28. i 42. dniu doświadczenia (odpowiednio 3,51 ± 0,35 pg ml^{-1}, 3,22 ± 0,43 pg ml^{-1}; $p < 0,01$).

W 14. dniu eksperymentu w grupie C stężenie IFN-γ w medium hodowlanym obniżyło się z poziomu 137,60 ± 32,93 pg ml^{-1} (dzień 0.) do 22,35 ± 9,49 pg ml^{-1} ($p < 0,001$), by następnie wzrastać liniowo do poziomu 97,14 ± 2,12 pg ml^{-1} (dzień 42.; $p < 0,05$). W grupie E ZEN spowodował liniowy statystycznie istotny spadek stężenia IFN-γ z 137,60 ± 32,93 pg ml^{-1} (dzień 0.), poprzez 12,87 ± 5,98 pg ml^{-1} (dzień 14., $p < 0,001$) do poziomu 5,93 ± 4,33 pg ml^{-1} (dzień 28., $p < 0,001$). Stężenie IFN-γ w 42. dniu w grupie E znalazło się poniżej progu detekcji.

W grupie C w dniu 0. i 14. stężenie w medium pohodowlanym IL-4 było poniżej poziomu wykrywalności. Ze stężenia 147,60 ± 4,32 pg ml^{-1} (28. dzień) zmalało do 16,43 ± 5,71 pg ml^{-1} (42. dzień, $p < 0,0001$). W 0. i 28. dniu doświadczenia w grupie E stężenie IL-4 spadło poniżej progu detekcji, natomiast w pozostałych terminach wykazywało tendencję wzrostową z poziomu 6,17 ± 0,10 pg ml^{-1} (dzień 14.) do 11,26 ± 1,86 pg ml-1 (dzień 42.). Stężenie IL-10 w grupie C zmalało z 16,20 ± 9,34 pg ml^{-1} (dzień 0.) do 9,13 ± 0,89 pg ml^{-1} (dzień 14.). Stężenie IL-10 w medium hodowlanym grupy E mieściło się w przedziale od 12,51 ± 7,60 pg ml^{-1} (dzień 14.) do 42,91 ± 4,70 pg ml^{-1} (dzień 28.). Zanotowane w 28. doświadczenia najwyższe stężenie było statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do dnia 0., 14. i 42 ($p < 0,05$).

Szczegółowo zagadnienia te omówiono w **publikacji drugiej (Obremski 2014b)** omawianego cyklu prac.

Wpływ ZEN na proces apoptozy i proliferacji limfocytów przebiegających w centrach rozrodczych kępek Peyera jelita biodrowego świń otrzymujących 14, 28 i 42 dni *per os* ZEN

W grupie loszek otrzymujących ZEN w 14. i 42. dniu doświadczenia w GC grudek chłonnych kępek Peyera jelita biodrowego, stwierdzono większą częstotliwość występowania apoptozy (+++) w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej.

Odmiennie kształtował się obraz zmian proliferacyjnych, ponieważ w grupie świń doświadczalnych w przeciągu całego eksperymentu względna częstotliwość mitozy była mniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej (+).

Analiza występowania aktywnej kaspazy-3 wykazała w każdym terminie badań na terenie GC kępek Peyera jelita biodrowego w grupie E jej wyższą aktywność w porównaniu do grupy C. W 14 dniu doświadczenia różnica pomiędzy grupą E a grupą C była statystycznie istotne wyższa ($p < 0.05$). Najwyższą wartość aktywnej kaspazy-3 w grupie E odnotowano w 28. dniu podawania ZEN i była ona statystycznie istotnie wyższa niż w dniu 42 ($p < 0.01$). W grupie C 28 dzień doświadczenia był również terminem największej aktywności kaspazy-3, statystycznie istotnie wyższym od dnia 14 i 42 (odpowiednio $p < 0.01$ i $p < 0.05$).

W 42 dniu doświadczenia w porównaniu z dniem 14 i 28 w grupach C i E procent komórek PCNA dodatnich był istotnie niższy (odpowiednio w obu terminach $p < 0,0001$ i $p < 0,01$). W grupie E w każdym z terminów doświadczenia procent komórek PCNA dodatnich był istotnie niższy w porównaniu do grupy C ($p < 0,0001$).

Jednostki składowe chromatyny, mono- i oligonukleosomy, zbudowane z histonów (H1, H2A, H2B, H3, H4), oplatających nić DNA, wykazywały statystycznie wyższy odsetek uwalniania w czasie hodowli *in vitro* limfocytów w grupie E w porównaniu do grupy C ($p < 0,05$).

Odpowiedz proliferacyjna limfocytów B kępek Peyera jelita biodrowego świń na mitogenne działanie LPS (10μg ml^{-1}) we wszystkich terminach doświadczenia w grupie E w porównaniu do grupy C była niższa nie wykazując jednak istotności statystycznej.

Szczegółowo zagadnienia te omówiono w **publikacji trzeciej (Obremski i Poniatowska-Broniek 2015a)** omawianego cyklu prac.

Potencjalne współzależności między niektórymi odpornościowymi i neuronalnymi elementami w kępkach Peyera jelita krętego u świń grupy kontrolnej i traktowanych ZEN

W kępkach Peyera jelita biodrowego grupy doświadczalnej odnotowano statystycznie ($p < 0,0001$) istotny spadek odsetka subpopulacji komórek CD21+ w porównaniu do grupy kontrolnej. Odsetek limfocytów T subpopulacji CD2+, CD4+CD8- i CD8+CD4- wykazywał wyższe wartości w grupie doświadczalnej w stosunku do zwierząt grupy kontrolnej, ale różnice nie wykazywały istotności statystycznej.

Podawanie świniom przez 42 dni ZEN doprowadziło do istotnego wzrostu stężenia IL-12/IL-23 p40 i IL-1β w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Stężenie IL-12/IL-23 p40 i IL-1β w grupie doświadczalnej było ponad 3 krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.

ZEN podawany świniom przez okres 7 tygodni spowodował wzrost zawartości SP i VIP ($p < 0,05$) w porównaniu do zwierząt grupy C.

Włókna immunoreaktywne dla SP i VIP obserwowano w błonie śluzowej jelita biodrowego zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i po podawaniu ZEN. U zwierząt grupy kontrolnej włókna immunoreaktywne w stosunku do VIP były rzadkie (++), podczas gdy immunoreaktywne do SP były bardziej liczne (+++). Ponadto u zwierząt kontrolnych włókna nerwowe VIP- i/lub SP-pozytywne były raczej delikatne i cienkie. Podawanie ZEN spowodowało dobrze widoczne zmiany w gęstości śluzówkowych włókien immunoreaktywnych na obie badane substancje. U zwierząt doświadczalnych VIP-podobne procesy immunoreaktywne były liczne, a nerwy immunopozytywne do SP tworzyły bardzo gęstą sieć. Pojawienie się włókien SP-dodatnich także zmieniło się po podaniu ZEN. Budowały one duże wiązki nerwowe i były grubsze i lepiej widoczne niż w warunkach fizjologicznych.

Szczegółowo zagadnienia te omówiono w **publikacji czwartej (Obremski i wsp. 2015b)** omawianego cyklu prac.

Stężenie ZEN i α-ZEL w wątrobie, kępkach Peyera jelita biodrowego i w węzłach biodrowo-okrężniczych po podawaniu *per os* ZEN w dawce poniżej wartości NOAEL przez okres 14, 28 i 42 dni

Stężenie ZEN i α-ZEL w próbkach wątroby, kępek Peyera jelita biodrowego i węzłach biodrowo-okrężniczych metodą HPLC. W próbkach grupy C nie stwierdzono obecności mikotoksyn. W wątrobie zwierząt grupy E stężenie ZEN i α-ZEL wynosiło odpowiednio $10,61 \pm 2,65$ ng g^{-1} – $12,22 \pm 1,89$ ng g^{-1} i $26,81 \pm 6,70$ ng g^{-1} – $54,20 \pm 33,47$ ng g^{-1}. Analiza chromatograficzna kępek Peyera grupy E, wykazała liniowy wzrost stężenia ZEN ($3,65 \pm 0,91$ ng g^{-1} – $4,72 \pm 1,85$ ng g^{-1}), przy braku obecności α-ZEL.

Analiza chromatograficzna w węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych grupy E wykazała stężenie ZEN w zakresie wartości $7,41 \pm 1,85$ ng g^{-1} – $9,13 \pm 5.93$ ng g^{-1}, przy braku obecności α-ZEL. Zarówno w próbkach wątrób, jak i węzłów biodrowo-okrężniczych najwyższy poziom ZEN i α-ZEL wystąpił w 28 dniu eksperymentu.

Szczegółowo zagadnienia te omówiono w **publikacji pierwszej (Obremski 2014a) i piątej (Obremski i wsp. 2015c)** omawianego cyklu prac.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania są pierwszymi, które zobrazowały w sposób ilościowy wybrane populacje limfocytów B, T i NK oraz rzeczywiste mikrośrodowisko cytokinowe tworzone przez limfocyty pomocnicze Th1/Th2 oraz makrofagi/monocyty w kępkach Peyera jelita biodrowego oraz w węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych świń będących pod wpływem ZEN podawanego *per os* w dawce poniżej wartości NOAEL.
2. Po raz pierwszy zbadano współzależność między niektórymi odpornościowymi i neuronalnymi elementami w kępkach Peyera jelita biodrowego u świń kontrolnych i traktowanych ZEN w dawce poniżej wartości NOAEL.
3. Metodą cytometrii przepływowej wykazano, że ZEN moduluje liczebność populacji limfocytów B, T i NK w kępkach Peyera jelita biodrowego. Świadczy o tym wzrost wartości odsetka komórek T CD4+CD8-, T CD4-CD8+, T CD4+CD8+ i komórek B_1 o fenotypie CD5+CD8- oraz spadek odsetka komórek NK o fenotypie CD5-CD8+ i komórek B CD21+.
4. Metodą cytometrii przepływowej wykazano, że ZEN moduluje liczebność populacji limfocytów w węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych. Świadczy o tym wzrost odsetka komórek T CD8+CD4-, TCRγδ+ oraz spadek odsetka komórek T CD2+, CD4+CD8- i komórek B CD21+.
5. Badania immunoenzymatyczne (ELISA) wykazały, że ekspozycja na ZEN promuje wydzielanie cytokin przez limfocyty pomocnicze Th1 (IL-2, IFN-γ) oraz cytokin prozapalnych produkowanych przez makrofagi/monocyty (IL-1β, IL-12/IL-23 p40,) przez co ZEN może pośrednio pełnić istotną rolę w uszkodzeniu jelit w procesie przewlekłego zapalenia (IBD - Inflammatory Bowel Disease).
6. Badania histologiczne wykazały, że ZEN zmniejsza mitotyczny i zwiększa apoptotyczny wskaźnik w centrach rozrodczych grudek chłonnych kępek Peyera jelita biodrowego świni.
7. Badania immunohistochemiczne wykazały, że ZEN hamuje proliferację i indukuje apoptozę w centrach rozrodczych grudek chłonnych kępek Peyera jelita biodrowego

świni, o czym świadczy spadek indeksu proliferacyjnego PCNA i wzrost aktywności kaspazy-3.

8. Kolometryczny test proliferacji komórkowej (MTT) wykazał, że mitogenna odpowiedz limfocytów B grudek chłonnych kępek Peyera jelita biodrowego uległa osłabieniu, natomiast test immunoenzymatyczny (ELISA) wykazał, że ekspozycja świń na ZEN w znacznym stopniu indukuje apoptozę.
9. Badania immunohistochemiczne wykazały, że ZEN zwiększył w błonie śluzowej jelita biodrowego ekspresję włókien VIP- i SP-ergicznych, a jednocześnie metodą dot-blot wykazano wzrost zawartości VIP i SP w kępkach Peyera jelita biodrowego. Świadczy to o możliwym wpływie ZEN na wzajemne oddziaływanie pomiędzy jelitowym układem immunologicznym i nerwowym, którego konsekwencją może być modulacja syntezy cytokin i/lub proliferacji/apoptozy limfocytów.
10. Metodą HPLC wykazano w kępkach Peyera jelita biodrowego i węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych stałą ekspozycję GALT i ENS na oddziaływanie ZEN, pomimo że był podawany świniom *per os* w dawce poniżej wartości NOAEL.

LITERATURA

Ahmadi K, Riazipour M (2008) Effects of T-2 toxin on cytokine production by mice peritoneal macrophages and lymph node T-cells. Iran J Immunol 5: 177-180.

Al-Anati L, Petzinger E (2006) Immunotoxic activity of ochratoxin A. J Vet Pharmacol Ther 29: 79–90.

Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A (2003) Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamin *in vitro* gastrointestinal model. Food Chem Toxicol 41: 1283-1290.

Bauer J, Heinritzi K, Gareis M, Gedek B (1987) Changes in the genital tract of female swine after feeding with practice-relevant amounts of zearalenone. Tierarztliche Praxis, 15, 33-36.

Bennett GA, Nelsen TC, Miller BM (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat, and pig feed : collaborative study. J AOAC Int 77: 1500-1509.

Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J (2013) Masked mycotoxins: A review. Mol Nutr Food Res 57: 165–186.

Bhandari N, Brown CC, Sharma RP (2002) Fumonisin B1-induced localized activation of cytokine network in mouse liver. Food Chem Toxicol 40; 1483–1491.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem 72: 248–254.

Brera C, Debegnach F, De Santis B, Di Ianni S, Gregori E, Neuhold S, Valitutti F (2014) Exposure assessment to mycotoxins in gluten-free diet for celiac patients. Food Chem Toxicol 69: 13–17.

Briani C, Samaroo D, Alaedini A (2008) Celiac disease: from gluten to autoimmunity. Autoimmun Rev 7: 644–650.

Bulc M, Gonkowski S, Landowski P, Kamińska B, Całka J (2015) Immunohistochemical evidence of the co-localisation of cocaine and amphetamine regulatory peptide with neuronal isoform of nitric oxide synthase, vasoactive intestinal peptide and galanin within the circular muscle layer of the human caecum. Folia Morphol (Warsz). 74: 176-182.

Cheli F, Pinotti L, Rossi L, Dell'Orto V (2013). Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review. LWT-Food Sci Technol 54: 307-314.

Christensen CM, Nelson GH, Mirocha CJ (1965) Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from Fusarium. Applied Microbiology 13: 653-659.

Christopher CP, Gong YY (2010) Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. Carcinogenesis 31: 71-82.

Dänicke S, Winkler J (2015) Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). Food Chem Toxicol 84: 225-249.

De Jong WH, Van Loveren H (2007) Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. Methods 41: 3-8.

Delgado M, Ganea D (2001) Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? J Immunol 166: 2907-2912.

Delgado M, Martinez C, Johnson MC, Gomariz RP, Ganea D (1996) Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. J Neuroimmunol 68: 27-28.

Döll S, Dänicke S (2011) The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. Prev Vet Med 102: 132–145.

Douglas SD, Leeman SE (2011) Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation. Ann N Y Acad Sci 1217: 83–95.

Duramad P, Holland NT (2011) Biomarkers of Immunotoxicity for Environmental and Public Health Research. Int J Environ Res Public Health 8: 1388–1401.

EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. EFSA J 9: 1-124.

Eriksen GS, Pennington J, Schlatter J, Alexander J, Thuvander A (2000) Zearalenone. In Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants; World Heath Organization: Geneva, Switzerland, 393–482.

European Commission (2006) Commission Recommendation No 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Off J Eur Union L229: 7–9.

Feher E, Pongor E, Altdorfer K, Kobori L, Lengyel G (2013) Neuroimmunomodulation in human autoimmune liver disease. Cell Tissue Res 354: 543–550.

Fink-Gremmels J, Malekinejad H (2007) Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. Anim Feed Sci Technol 137: 326–341.

Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK (2015) Immunoregulatory Pathways Involved in Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis 21: 2188-2193.

Fox EM, Howlett BJ (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. Curr Opin Microbiol 11: 481–7.

Gajęcka M, Rybarczyk L, Jakimiuk E, Zielonka Ł, Obremski K, Zwierzchowski W, Gajęcki M (2012) The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. Exp Toxicol Pathol 64: 537– 542.

Gajęcka M, Rybarczyk L, Jakimiuk E, Zielonka Ł, Obremski K, Zwierzchowski W, Gajęcki M (2012) The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. Exp Toxicol Pathol 64: 537– 542.

Gajęcka M, Rybarczyk L, Zwierzchowski W, Jakimiuk E, Zielonka Ł, Obremski K, Gajęcki M (2011) The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. Theriogenology 75: 1085–1094.

Gajęcki M, Gajęcka M, Zielonka Ł, Jakimiuk E, Obremski K (2006) Zearalenone as a potential allergen in the alimentary tract – a review. Pol J Food Nutr Sci 15/56: 263–268.

Gallo A, Giuberti G, Frisvad JC, Bertuzzi T, Nielsen KF (2015) Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status

and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. Toxins (Basel) 12;7: 3057-3111.

Ganea D, Hooper KM, Kong W (2015) The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. Acta Physiol (Oxf) 213: 442-452.

Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S (2014) Plasticity of human CD4 T cell subsets. Front Immunol 5: 630

Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. Immunologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Goliński P, Waśkiewicz A, Gromadzka K (2009) Mycotoxins and mycotoxicoses under climatic conditions of Poland. Pol J Vet Sci 12: 581-588.

Gonkowski S (2013) Substance P as a neuronal factor in the enteric nervous system of the porcine descending colon in physiological conditions and during selected pathogenic processes. Biofactors 39: 542-551.

Gonkowski S, Calka J (2012) Changes in pituitary adenylate cyclaseactivating Peptide 27-like immunoreactive nervous structures in the porcine descending colon during selected pathological processes. J Mol Neurosci 48: 777–787.

Gonkowski S, Kaminska B, Bossowska A, Korzon M, Landowski P, Majewski M (2003) The influence of experimental Bacteroides fragilis infection on substance P and somatostatin-immunoreactive neural elements in the porcine ascending colon—a preliminary report. Folia Morphol 62: 455–457.

Gonkowski S, Obremski K, Calka J (2015) The Influence of Low Doses of Zearalenone on Distribution of Selected Active Substances in Nerve Fibers Within the Circular Muscle Layer of Porcine Ileum. J Mol Neurosci 56: 878-886.

Habschied K, Šarkanj B, Klapec T, Krstanovic V (2011) Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on Fusarium graminearum growing conditions, Food Chem 129: 329–332.

Heidari S, Milani J, Nazari SS (2014) Effect of the bread-making process on zearalenone levels. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 31: 2047-2054.

Heussner AH, Bingle LE (2015) Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. Toxins (Basel) 22: 4253-4282.

Hueza IM, Raspantini PC, Raspantini LE, Latorre AO, Górniak SL (2014) Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. Toxins (Basel) 6: 1080-1095.

Inadera H (2006) The immune system as a target for environmental chemicals: xenoestrogens and other compounds. Toxicol Lett 164: 191-206.

Ivanova EA, Orekhov AN (2015) T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. Biomed Res Int 2015:327470. doi: 10.1155/2015/327470

Jakimiuk E, Gajecka M, Jana B, Obremski K, Gajęcki M (2010) Effect of zearalenone on steroid secretion by porcine follicular cells in mono- and coculture. Bull Vet Inst Pulawy 54: 419-423.

Jakimiuk E, Rybarczyk L, Zwierzchowski W, Obremski K, Gajęcka M, Zielonka Ł, Gajęcki M (2010) Effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone

mycotoxicosis on selected morphometric parameters of the reproductive tract in sexually-immature gilts. Bull Vet Inst Pulawy 54: 25-28.

Jankovic D, Feng CG (2015) CD4(+) T Cell Differentiation in Infection: Amendments to the Th1/Th2 Axiom. Front Immunol 29; 6:198.

Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Pérez-García S, Carrión M, Gomariz RP, Juarranz Y (2012) Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells. Immunol Cell Biol 90: 178-186.

Juan C, Ritieni A, Mañes J (2013) Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. Food Chem 141: 1747–1755.

Kanora A, Maes D (2009) The role of mycotoxins in pig reproduction: A review. Vet Med-Czech 54: 565–576.

Kim DH, Lee IH, Do WH, Nam WS, Li H, Jang HS, Lee C (2013) Incidence and levels of deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone contaminants in animal feeds used in Korea in 2012. Toxins (Basel) 23;6: 20-32.

Kostelanska M, Dzuman Z, Malachova A, Capouchova I, Prokinova E, Skerikova A, Hajslova J (2011) Effects of milling and baking technologies on levels of deoxynivalenol and its masked form deoxynivalenol-3-glucoside. J Agric Food Chem 14;59: 9303-9312.

Kostro K, Gajęcka M, Lisiecka U, Majer-Dziedzic B, Obremski K, Zielonka Ł, Gajęcki M (2011) Subpopulation of lymphocytes CD4+ AND CD8+ in peripheral blood of sheep with zearalenone mycotoxicosis. Bull Vet Inst Pulawy 55: 241-246.

Křivohlávková L, Hošková K, Krejcárková A, Rajmon R (2013) Activity of soy phytoestrogens and zearalenone on mammalian reproduction: a review. Scientia agriculturae bohemica, 44: 119–126

Kubizna J, Jamroz D, Petryna M (2010) A survey of cereal grains contamination with mycotoxin in south western and western region of Poland. Zesz Nauk UP Wroc, Biol Hod Zwierz LXI, 579: 199–213.

Laurenzi MA, Persson MA, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A (1990) The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. Scand J Immunol 31: 529-533.

Li M, Cuff CF, Pestka J (2005) Modulation of murine host response to enteric reovirus infection by the trichothecene deoxynivalenol. Toxicol Sci 87:134-145.

Li M, Cuff CF, Pestka JJ (2005) Modulation of murine host response to enteric reovirus infection by the trichothecene deoxynivalenol. Toxicol Sci (87) 134–145.

Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salzano S, Ursini MV (2004) Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. Mutat Res 557: 19-27.

Luft P, Oostingh GJ, Gruijthuijsen Y, Horejs-Hoeck J, Lehmann I, Duschl A (2008) Patulin influences the expression of Th1/Th2 cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells and T cells through depletion of intracellular glutathione. Environ Toxicol (23) 84–95.

Luongo D, Severino L, Bergamo P, De Luna R, Lucisano A, Rossi M (2006) Interactive effects of fumonisin B1 and α-zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells. Toxicol in Vitro 20: 1403–1410.

Maresca M, Fantini J (2010) Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. Toxicon 56: 282–294.

Marin DE, Taranu I, Bunaciu RP, Pascale F, Tudor DS, Avram N, Sarca M, Cureu I, Criste, RD, Suta V, Oswald IP (2002) Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. J Anim Sci 80: 1250–1257.

Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013) Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem Toxicol 60: 218-237.

Marriott I, Mason MJ, Elhofy A, Bost KL (2000) Substance P activates NF-kappa B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. J Neuroimmunol 102: 163-171.

Maślanka T (2010) Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD4+. Med Weter 66: 827-832.

Mazur LJ, Kim J (2006) Spectrum of noninfectious health effects from molds. Pediatrics 118: e1909–e1926.

McErlean BA (1952) Vulvovaginitis of swine. Veterinary Record 64: 539-540.

McNutt SH, Purwin P, Murray C (1928) Vulvo vaginitis in swine: preliminary report. J Am Vet Med Assoc 73: 484-492.

Mehmood Z, Smith AG, Tucker MJ, Chuzel F, Carmichel NG (2000) The development of methods for assessing the in vivo estrogen like effects of xenobiotics in CD-1 mice. Food Chem Toxicol 38: 493–501.

Milićević DR, Škrinjar M, Baltić T (2010) Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. Toxins 2: 572–592.

Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M (2014) Heterogeneity in the differentiation and function of $CD8^+$ T cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 62: 449-458.

Mosmann TR, Coffman RI (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol 7: 145–173.

Müller MEH, Korn U (2013) Alternaria mycotoxins in wheat – A 10 years survey in the Northeast of Germany. Food Control 34: 191–197.

Muranski P, Restifo NP (2013) Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. Blood 28;121: 2402-2414.

Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, Berthiller F, Applegate TJ, Grenier B, Phillips TD, Schatzmayr G (2015) Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. Poult Sci 94: 1298-1315.

Nakamura U, Kadokawa H (2015) The nonsteroidal mycoestrogen zearalenone and its five metabolites suppress LH secretion from the bovine anterior pituitary cells via the estradiol receptor GPR30 in vitro. Theriogenology 84:1342-1349.

Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W (2013) Charakterystyka subpopulacji limfocytów T. Postepy Hig Med Dosw (online) 67: 371-379.

Nordkvist E, Häggblom P (2014) Fusarium mycotoxin contamination of cereals and beddingstraw at Swedish pig farms. Anim Feed Sci Tech 198: 231–237.

Nowak A, Slizewska K, Gajecka M, Piotrowska M, Zakowska Z, Zielonka L, Gajecki M (2015) The genotoxicity of caecal water from gilts following experimentally induced Fusarium mycotoxicosis. Vet Med-Czech 60: 133–140.

Obremski K (2014a) Changes in Th1 and Th2 cytokine concentrations in ileal Peyer's patches in gilts exposed to zearalenone. Pol J Vet Sci 17: 53-59.

Obremski K (2014b) The effect of in vivo exposure to zearalenone on cytokine secretion by Th1 and Th2 lymphocytes in porcine Peyer's patches after *in vitro* stimulation with LPS. Pol J Vet Sci 17: 625–632.

Obremski K, Gajecka M, Zielonka, Jakimiuk E, Gajecki M (2005) Morphology and ultrastructure of small intestine mucosa in gilts with zearalenone mycotoxicosis. Pol J Vet Sci 8: 301–307.

Obremski K, Gajęcki M, Zwierzchowski W, Bakuła T, Apoznański J, Wojciechowski J (2003b) The level of zearalenone and α-zearalenol in the blood of gilts after feeding them of feed with a low content of zearalenone. J Anim Feed Sci 12: 529-538.

Obremski K, Gajęcki M, Zwierzchowski W, Zielonka Ł, Otrocka-Domagała I, Rotkiewicz T, Mikołajczyk A, Gajęcka M, Polak M (2003a) Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts. Pol J Vet Sci 6: 239–245.

Obremski K, Gonkowski S, Wojtacha P (2015b) Zearalenone-induced changes in lymphoid tissue and mucosal nerve fibers in the porcine ileum. Pol J Vet Sci 18: 357–365.

Obremski K, Podlasz P, Żmigrodzka M, Winnicka A, Woźny M, Brzuzan P, Jakimiuk E, Wojtacha P, Gajęcka M, Zielonka Ł, Gajęcki M (2013): The effect of T-2 toxin on changes in the percentages of CD4+, CD8+, CD4+CD8+ and CD21+ lymphocytes and mRNA expression levels of selected cytokines in porcine ileal Peyer's patches. Pol J Vet Sci. 16 341-349.

Obremski K, Poniatowska-Broniek G (2015a) Zearalenone induces apoptosis and inhibits proliferation in porcine ileal Peyer's patch lymphocytes. Pol J Vet Sci 18: 153–161.

Obremski K, Wojtacha P, Podlasz P, Żmigrodzka M (2015c) The influence of experimental administration of low zearalenone doses on the expression of Th1 and Th2 cytokines and on selected subpopulations of lymphocytes in intestinal lymph nodes. Pol J Vet Sci 18: 489–497.

Obremski K, Zielonka Ł, Gajęcka M, Jakimiuk E, Bakuła T, Baranowski M, Gajęcki M (2008) Histological estimation of the small intestine wall after administration of feed containing deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in the pig. Pol J Vet Sci 11: 339–345.

Obremski K, Zielonka Ł, Gajęcka M, Jakimiuk E, Gajęcki M (2009) Mycotoxins – dairy cattle breeding problem. A case report. Bull Vet Inst Pulawy 53: 221-224.

Obremski K., Gajęcki M., Zwierzchowski W., Zielonka Ł., Skorka-Wyszyńska E., Gajęcka M., Polak M., Jakimiuk E., Wojciechowski J. (2004) Ocena kliniczno-laboratoryjna mikotoksykozy zearalenonowej u loszek. Medycyna Wet. 60(8), 867-870.

Paterson RRM, Lima N (2010) How will climate change affect mycotoxins in food? Food Research International 43: 1902–1914.

Pleadin J, Sokolović M, Perši, N, Zadravec M, Jaki V, Vulić A (2012) Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. Food Control 28: 94–98.

Ran WZ, Dong L, Tang CY, Zhou Y, Sun GY, Liu T, Liu YP, Guan CX (2015) Vasoactive intestinal peptide suppresses macrophage-mediated inflammation by downregulating interleukin-17A expression via PKA- and PKC-dependent pathways. Int J Exp Pathol 96: 269-275.

Reinhold L, Reinhardt K. (2011) Mycotoxins in foods in Lower Saxony (Germany): results of official control analyses performed in 2009. Mycotoxin research 27:137–143.

Rodrigues I, Naehrer K (2012) A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed, Toxins 4: 663–675.

Schmitt N, Ueno H (2015) Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. Curr Opin Immunol 34: 130-136.

Schoevers EJ, Santos RR, Colenbrander B, Fink-Gremmels J, Roelen BA (2012) Transgenerational toxicity of zearalenone in pigs. Reprod Toxicol 34: 110–119.

Sharma RP (1993) Immunotoxicity of mycotoxins. J Dairy Sci 76: 892–897.

Sirianni M C, Annibale B, Tagliaferri F, Fais S, De Luca S, Pallone F, Delle Fave G, Aiuti F (1992) Modulation of human natural killer activity by vasoactive intestinal peptide (VIP) family. VIP, glucagon and GHRF specifically inhibit NK activity. Regul Pept 38: 79-87.

Stob M, Baldwin RS, Tuite J, Andrews FN, Gillette KG (1962) Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with Gibberella zeae. Nature 196: 1318.

Stoev SD (2013) Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. Crit Rev Food Sci 53: 887–901.

Streit E, Schatzmayr G, Tassi P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald IP (2012) Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed–focus on Europe. Toxins (Basel) 4: 788–809.

Taranu I, Braicu C, Marin DE, Pistol GC, Motiu M, Balacescu L, Neagoe IB, Burlacu R (2015) Exposure to zearalenone mycotoxin alters in vitro porcine intestinal epithelial cells by differential gene expression. Toxicol Lett 232: 310–325.

Taranu I, Marin DE, Bouhet S, Pascale F, Bailly JD Miller JD, Pinton P, Oswald IP (2005) Mycotoxin Fumonisin B_1 Alters the Cytokine Profile and Decreases the Vaccinal Antibody Titer in Pigs. Toxicol Sci 84: 301–307

Turcotte JC, Hunt PJ, Blaustein JD (2005) Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progestin receptors and sexual behavior in female rats. Horm Behav 47: 178–184.

Van der Fels-Klerx HJ, Klemsdal S, Hietaniemi V, Lindblad M, Ioannou-Kakouriand I, Van Asselt ED (2012) Mycotoxin contamination of cereal graincommodities in relation to climate in North West Europe. Food Addit Contam A 29: 1581–1592.

Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R (2006) Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. Auton Neurosci 126–127: 264–272.

Vidal A, Marín S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013) Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. Food Chem Toxicol 53: 133-138.

Weinstock JV (2015) Substance P and the regulation of inflammation in infections and inflammatory bowel disease. Acta Physiol 213: 453–461.

Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I (2002) The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. Environ Toxicol 17: 211–218.

Wojas J, Pajtasz-Piasecka E (2010) Dendritic cell – regulatory T-cell interaction. Postepy Hig Med Dosw (online) 64: 167-174.

Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison L W, Pillai MR, Vignali DA (2009) The development and function of regulatory T cells. Cell Mol Life Sci 66: 2603-2622.

Yiangou Y, Serrano R, Bloom SR, Pena J, Festenstein H (1990) Effects of prepro-vasoactive intestinal peptide-derived peptides on the murine immune response. J Neuroimmunol 29: 65-72.

Yoshinari T, Takeuchi H, Aoyama K, Taniguchi M, Hashiguchi S, Kai S, Ogiso M, Sato T, Akiyama Y, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Ishikuro E, Sugita-Konishi Y (2014) Occurrence of four Fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, and HT-2 toxin, in wheat, barley, and Japanese retail food. J Food Prot 77: 1940-1946.

Zielonka Ł, Gorlo G, Obremski K, Gajęcka M, Jakimiuk E, Gajęcki M (2009) Histopathology of selected organs of the reproductive tract of pigs supplied with feeed containing zearalenone containing zearalenone destroyer. Bull Vet Inst Pulawy 53: 411-414.

Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food Chem Toxicol 45: 1–18.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Oprócz prac wchodzących w skład wyżej opisanego osiągnięcia naukowego, jestem autorem lub współautorem 59 opracowań (32 opublikowano w czasopismach z listy JCR, pozostałe 27 w innych czasopismach krajowych), w tym 49 prac oryginalnych i 10 artykułów przeglądowych. Mój pozostały dorobek naukowy stanowi 6 rozdziałów w monografiach w języku polskim (5) i angielskim (1), 62 komunikaty naukowe, prezentowane na konferencjach krajowych (46) i zagranicznych (16) oraz jedno zgłoszenie patentowe.

5.1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych

Po ukończeniu studiów w roku 1992 i okresie trzy letniej pracy w Lecznicy dla zwierząt w Gdyni, w roku 1995 zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydziału Weterynaryjnego Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie, kierowanej przez prof. dr hab. Franciszka Przałę. Po opanowaniu warsztatu badawczego stosowanego w Katedrze, czyli wykonywaniu oznaczeń parametrów hematologicznych i biochemicznych krwi oraz pomiarów parametrów zoohigienicznych mikroklimatu pomieszczeń inwentarskich, zacząłem uczestniczyć w pracach doświadczalnych prowadzonych w Katedrze. Tematyka badawcza w tym czasie skupiała się na problematyce zoohigienicznej oraz badaniach etiologiczno-klinicznych wczesnego okresu postnatalnego zwierząt gospodarskich. Prowadzono również badania z zakresu wpływu mikroflory pomieszczeń na zasiedlanie przewodu pokarmowego koźląt osesków. Ponadto prowadzono badania nad wpływem dodatków paszowych na rozród i zdrowotność (odchów) świń, monitorując podstawowe parametry biochemiczne i hematologiczne krwi. Mój dorobek naukowy z tego okresu stanowią 2 artykuły przeglądowe nr: **A 2.4** i **A 2.5** oraz 17 doniesień konferencyjnych nr: **A 2.1, A 2.2, A 2.3, A 2.6, A 2.7, A 2.8, A 2.9, A 2.10, A 2.11, A 2.12, A 2.13, A 2.14, A 2.15, A 2.16, A 2.17, A 2.18, A 2.19**.

Po objęciu kierownictwa Katedry przez prof. dr hab. Macieja Gajęckiego, późniejszego promotora mojej rozprawy doktorskiej, profil badawczy zespołu uległ zmianie. Dominującym tematem stały się zagadnienia związane z wtórnymi metabolitami grzybów pleśniowych (mikotoksynami) i ich wpływem na zdrowotność zwierząt. Badania głównie dotyczyły zearalenonu (ZEN), ale również innej produkowanej przez grzyby *Fusarium* mikotoksyny, a mianowicie deoksyniwalenolu (DON).

Kierunek badań obrany wówczas przeze mnie stał się podstawą mojej późniejszej rozprawy doktorskiej. Badania dotyczyły ustalenia dla potrzeb diagnostycznych poziomów ZEN i α-zearalenolu (α-ZEL) w osoczu świń podczas podawania najniższej dawki wywołującej kliniczne objawy hiperestrogenizmu (LOAEL) i jej wielokrotności. Dodatkowymi celami badawczymi, które realizowałem była ocena wpływu niskich dawek ZEN podawanych *per os* na wybrane wskaźniki biochemiczne surowicy krwi, wybrane wskaźniki hematologiczne oraz powstawanie zmian anatomopatologicznych w wybranych narządach wewnętrznych. Realizacja tych założeń była związana z projektem badawczym pt. *Ustalenie wartości diagnostycznych poziomów metabolitów zearalenonu w surowicy krwi*

loszek po żywieniu paszami skażonymi zearalenonem **(1999)** – KBN 5 PO6K 002 17, w którego powstanie i realizację byłem czynnie zaangażowany.

Realizację założonych celów rozpocząłem od opracowania autorskiej metody oznaczenia ZEN i jego metabolitów w matrycy biologicznej, jaką jest osocze krwi. Do osiągnięcia tego celu wykorzystałem po raz pierwszy w Katedrze metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD). Działanie to polegało na opracowaniu metody oznaczenia całkowitego ZEN i α-ZEL we krwi świń. Prace nad opracowaniem metodyki dotyczyły określenia warunków analizy chromatograficznej, gwarantującej prawidłowy rozdział analitów, czyli doborze odpowiedniej kolumny chromatograficznej, procentowego składu i szybkości przepływu fazy ruchomej, temperatury pieca kolumny, długości fali wzbudzenia (λEx) i długości fali emisji (λEm). Kluczowym zadaniem było opracowanie sposobu obróbki próbki osocza krwi, czyli czasu i warunków inkubacji jej z β-glukuronidazą celem rozbicia połączenia ZEN i α-ZEL z kwasem glukuronowym, odpowiedniego pH mieszaniny, optymalizacji roztworu ekstrakcyjnego i sposobu separacji ZEN i α-ZEL (kolumny SPE, czy immunoafinitywne - IAC). Nadrzędnym zadaniem było uzyskanie akceptowanego i jednocześnie możliwie najwyższego odzysku analitu z matrycy. Prace prowadziłem na osoczu pozyskanym od świń grup doświadczalnych, którym wg metodyki projektu podawano w żelatynowych kapsułkach ZEN w dawce LOAEL (200 μg kg^{-1} paszy) i 2 razy większej od LOAEL (400 μg kg^{-1} paszy).

Badania wykazały, że zastosowanie kolumn immunoafinitywnych (IAC) skróciło czas analizy chromatograficznej i dało możliwość separacji ZEN i α-ZEL z krwi oraz co istotne uzyskano zadawalający odzysk na poziomie 90-95% przy minimalizacji szumów. Podanie ZEN *per os* w dawce LOAEL spowodowało wystąpienie słabo wyrażonych objawów hiperestrogenizmu u niedojrzałych płciowo loszek, natomiast przy dawce 2 razy większej od LOAEL, objawy kliniczne hiperestrogenizmu były o wiele bardziej nasilone. Uzyskane wartości hematologiczne i biochemiczne surowicy krwi wskazały jednoznacznie na zaburzenia homeostazy organizmu badanych zwierząt, wywołany podawanym ZEN, a wyrażony zwiększoną aktywnością enzymów wątrobowych. Badania histopatologiczne wybranych narządów wewnętrznych loszek, wykazały nasilenie proliferacji komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy i pochwy, silniej wyrażonej w grupie otrzymującej wyższą dawkę ZEN. Stwierdzono, że w przypadku wystąpienia u loszek słabo wyrażonych objawów rujowych, przy braku odruchu tolerancji należy określać poziom ZEN i jego pochodnych we krwi. Zwieńczeniem tego etapu mojej działalności naukowej była dysertacja doktorska pt. „Próba doświadczalnego ustalenia wartości diagnostycznych poziomów

zearalenonu i jego metabolitów we krwi loszek", której publiczna obrona odbyła się 30.XI.2001 na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

5.2. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych

Na mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora, z wyłączeniem prac zaliczonych w poczet osiągnięcia habilitacyjnego, składa się 57 publikacji (49 prac oryginalnych i 8 przeglądowych), 6 rozdziałów w monografiach i 45 doniesień konferencyjnych oraz jedno zgłoszenie patentowe.

Wyniki badań stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej opublikowano w 5 pracach oryginalnych nr: **B 1.3, B 1.5, B 1.11, B 1.18, B 1.23.**

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania naukowe nadal koncentrowały się na problematyce mikotoksyn, w szczególności na ZEN i zasadniczo interesowały mnie w trzech aspektach:

a) analiza mikotoksyn, a w szczególności ZEN metodą chromatograficzną (HPLC) w materiale roślinnym i tkankach ludzi i zwierząt,
b) estrogenny wpływ ZEN na układ rozrodczy zwierząt hodowlanych i towarzyszących,
c) wpływ ZEN i toksyny T-2 na jelitowy układ odpornościowy u świń.

W badaniach posługiwałem się metodami fotometrycznymi (EPOL-20), metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), metodami histo- i immunohistochemicznymi, metodami biologii molekularnej (RT-PCR, Dot-Blot), metodą cytometrii przepływowej oraz ilościową metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Doświadczenia prowadziłem w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* na hodowlach pierwotnych limfocytów wyizolowanych z narządów limfatycznych (GALT) świń. Badania dotyczyły przede wszystkim świni - zwierzęcia, którego znaczenie, jako zwierzęcia eksperymentalnego, chyba najbardziej optymalnego w badaniach biomedycznych, ciągle wzrasta. Ponadto modelem doświadczalnym były również psy, a w ostatnim czasie ryby (pstrągi). Część badań dotyczyła także człowieka.

W kolejnych latach w modelu prowadzonych przeze mnie badań uległa zmiana wysokość stosowanej dawki ZEN. Stosowaliśmy już coraz niższe dawki ZEN, dochodząc w konsekwencji do wartości NOAEL (10 μg kg^{-1}) i poniżej. Uzyskane wyniki prowadzonych

badań zostały opublikowane w pracach oryginalnych nr: **B 1.3, B 1.4. B 1.5, B 1.11, B 1.18, B 1.20, B 1.23, B 1.25** i innych publikacjach naukowych nr: **B 2.1, B 2.4, B 2.10, B 2.17**.

W tym samym czasie, byłem współwykonawcą kolejnego projektu badawczego realizowanego w Katedrze – *Monitoring występowania zearalenonu w płynach ustrojowych kobiet dotkniętych nowotworzeniem w obrębie układu rozrodczego w odniesieniu do zmian w układzie rozrodczym niedojrzałych płciowo loszek przy niskodawkowej, długoterminowej mikotoksykozie* **(2002)** – 3 P05E 150 25. Wśród zadań badawczych, w które byłem czynnie zaangażowany był 12 miesięczny monitoring ZEN i α-ZEL we krwi kobiet ze zmianami nowotworowymi w obrębie układu rozrodczego. Opracowana wcześniej przeze mnie metodyka oznaczania ZEN i jego metabolitów w krwi, stała się uzupełniającym badaniem diagnostycznym pacjentek z Oddziału Ginekologii Operacyjnej i Perinatologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie. Efektem prowadzonego projektu było wykazanie, że w badanej grupie kobiet z nowotworami gruczołu piersiowego, stwierdzono obecność ZEN w osoczu krwi. Wykazaliśmy, że wyższe stężenie ZEN występowało u pacjentek z niezłośliwymi nowotworami gruczołu piersiowego. Okazało się, że w przypadku raków gruczołu piersiowego, obecność ZEN nie wpłynęła na stopień zaawansowania nowotworu, rodzaj raka, stopień złośliwości, mutację genów BRCA1 i BRCA2. Zauważono natomiast mniejszą ekspresję receptora HER-2 w tej grupie. Obecność ZEN zbiegła się z wysoką aktywnością receptora progesteronowego, a niską estrogenowego oraz, że ZEN mógł być jednym z czynników ryzyka powstawania nowotworów gruczołu piersiowego. Pokłosiem badań było opublikowanie z moim współautorstwem dwóch prac oryginalnych nr: **B 1.9, B 1.33** i komunikatu konferencyjnego nr: **B 2.20**.

Kolejny temat badawczy, który wzbudził moje zainteresowanie to obecność ZEN i innych mikotoksyn w materiałach paszowych i paszach. Rozwijane i pogłębiane umiejętności analityczne (ukończenie Studiów podyplomowych w zakresie Analityki w Ochronie Środowiska na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu), związane z oznaczaniem mikotoksyn metodą HPLC, stały się motorem działań do powiększenia mojego „warsztatu analitycznego". Wdrożyłem kolejne metody analizy innych mikotoksyn niż ZEN a mianowicie aflatoksyn, deoksyniwalenolu, ochratoksyny A i toksyny T-2. Była to również potrzeba chwili, na wzrastające zainteresowanie hodowców zwierząt i producentów materiałów roślinnych na monitoring mikotoksyn i zmniejszenie ich poziomu w paszach. Byliśmy jednak świadomi tego, że nawet najlepsza strategia zarządzania, nie wyeliminuje faktu infestacji mikotoksynami materiału roślinnego. W konsekwencji do Katedry zaczęły napływać zlecenia badań materiałów paszowych i pasz na obecność mikotoksyn oraz prośby

o ocenę konsekwencji zdrowotnych u zwierząt, które uległy zatruciami mikotoksynami. Cała sytuacja zaowocowała uruchomieniem tematu naukowo-badawczo-usługowego pt "Badanie pasz, materiałów paszowych, tkanek zwierzęcych i płynów ustrojowych na obecność mikotoksyn", którego kierownikiem jestem do chwili obecnej. Na te potrzeby powstało w Katedrze również Laboratorium Badań Toksykologicznych, które jest wyposażone w niezbędny sprzęt (chromatografy) do wykonywania oznaczeń toksykologicznych. Uzyskane w tej działalności wyniki zaowocowały publikacjami przeglądowymi nr: **B 2.2, B 2.22** oraz opracowaniami zbiorowymi w formie publikacji rozdziałów w książkach nr: **B 1.43, B 1.46, B 1.49** i **B 1.50.** W późniejszym czasie wspólnie z współpracownikami Katedry wykonałem walidację chromatograficznej metody oznaczania ZEN, α-ZEL i DON w takich matrycach, jak zboże i surowica krwi. Badania walidacyjne wykonano w ramach zadania badawczego, którego byłem kierownikiem: *„Walidacja metod chromatograficznego oznaczania zearalenonu, α-zearalenolu i deoksyniwalenolu w paszy i krwi świń”*, będącego częścią projektu rozwojowego własnego – *Określenie wpływu eksperymentalnej mikotoksykozy fuzaryjnej na wybrane wskaźniki diagnostyczno-morfologiczne przewodu pokarmowego świni* (2010) – NCBIR NR12-0080-10/2010. Przeprowadzona walidacja wykazała, że we wszystkich badanych punktach kontrolnych dla ZEN, α-ZEL i DON (LQC, IQC, MQC, HQC) w obrębie partii (dzień wykonywania oznaczeń) i pomiędzy partiami (pomiędzy dniami wykonywanych oznaczeń) zachowane były kryteria akceptacji dla precyzji (% Bias nie przekraczał ±15%), dokładności (CV nie przekraczało ±15%), zachowana była liniowość metody (krzywa korelacji dla każdego z analitu powyżej r = 0,99), a średni całkowity % odzysk był powyżej 90%. Dla poszczególnych mikotoksyn określono granicę wykrywalności (LOD) i granicę oznaczalności (LOQ).

Kolejnym tematem badawczym, który wzbudził moje zainteresowanie to dość powszechny problem mikotoksykoz. Występujące zarówno u ludzi, jak i u zwierząt mikotoksykozy są nie zakaźnymi i nie zaraźliwymi jednostkami chorobowymi, których czynnikiem etiologicznym są obecne w środkach spożywczych lub paszach mikotoksyny (Zadanie badawcze – *Oznaczanie poziomu wybranych mikotoksyn fuzaryjnych w wytypowanych ziarnach zbóż poddanych stresowi infekcyjnemu wraz z oceną na modelu zwierzęcym oddziaływania białek o zmienionej strukturze na błonę śluzową przewodu pokarmowego* (2004) – w ramach Projektu Badawczego Zamawianego – pt. „Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergenności białek ważnych roślin uprawnych” – PBZ-KBN-097/P06/2003). Kliniczne objawy mikotoksykoz u zwierząt są zróżnicowane i są uzależnione od gatunku, wielkości pobranej dawki, stanu fizjologicznego i wieku. Pod

wpływem różnych dawek mikotoksyn, mikotoksykoza może mieć przebieg subkliniczny, podostry, ostry lub przewlekły. Niektóre z mikotoksyn wykazują wpływ na układ immunologiczny, hamując lub pobudzając odpowiedz immunologiczną. Immunosupresyjny wpływ tych związków może zwiększać wrażliwość ludzi/zwierząt na czynniki infekcyjne, natomiast immunostymulacyjny może skutkować zwiększeniem prozapalnej odpowiedzi organizmu. Poszczególne mikotoksykozy występują nieregularnie, sezonowo w określonych obszarach geograficznych, co utrudnia wdrożenie skutecznego działania zapobiegawczego. Prace związane z tą tematyką badań, w których czynnie uczestniczyłem zaowocowały publikacjami oryginalnymi nr: **B 1.19, B 1.26, B 1.40, B 1.48, B 1.53** i przeglądowymi nr: **B 1.31, B 1.38, B 2.9**.

Ścisły kontakt z praktyką terenową i częste badanie karm i pasz dla zwierząt gospodarskich i towarzyszących na obecność mikotoksyn, zwrócił naszą uwagę na dość powszechne występowanie problemów zdrowotnych związanych z obecnością ZEN. Wykonane z moim udziałem badania monitoringowe, wykazały zróżnicowane zawartości tego ksenobiotyku. Stwierdziliśmy obecność ZEN w 42 na 45 badanych próbek karm dla psów, w ilości 5,0 do 299,5 μg kg^{-1}. U suk, jako zwierząt sezonowo monoestralnych, stosunkowo często występują zaburzenia funkcji układu rozrodczego, takie jak endometritis-pyometra, przedłużona ruja, torbiele jajnikowe i inne. Podejrzewa się wtedy, że istotną rolę w ich etiopatogenezie odgrywa specyficzna dla tego gatunku regulacja hormonalna procesów rozrodczych, polegająca na długim trwaniu proestrus i estrus, długich cyklach progesteronowych i prolaktynowych oraz dużej wrażliwości tych zwierząt na estrogeny. Ponadto błędy w sztuce lekarskiej, związane głównie z niewłaściwym podawaniem hormonów (antykoncepcja) są często przyczyną stanów patologicznych narządu rodnego suk. Czynnikiem zupełnie pomijanym w literaturze była obecność w karmie ZEN. Uzyskane w badaniach wyniki wskazały, że obecność ZEN nawet w niskich dawkach nabiera znaczenia, ponieważ suki bardzo często są żywione monodietą stosowaną przez wiele miesięcy, w której permanentnie narażone są na ZEN.

Badania nad wpływem ZEN na organizm suk, w których brałem czynny udział prowadzono w ramach dwóch projektów badawczych: *Wpływ zearalenonu na organizm suk na podstawie wybranych wskaźników* (2003) – KBN 2 P06K 007 26 oraz *Obraz zmian w wybranych tkankach suk, jako wynik krótkoterminowej mikotoksykozy zearalenonowej* (2008) – N N308 242635. Wyniki naszych badań zostały opublikowane w pracach oryginalnych nr: **B 1.6, B 1.15, B 1.16, B 1.28, B 1.29, B 1.32, B 1.35** i **B 1.36** i na tematycznych

konferencjach naukowych nr: **B 2.3, B 2.5, B 2.14, B 2.15, B 2.19, B 2.26, B 2.28, B 2.32, B 2.50**.

Kolejnym obszarem badań prowadzonych w Katedrze, w które byłem czynnie zaangażowany to prace nad różnymi sposobami unieczynniania (detoksykacji) ZEN w materiale roślinnym. Badania były realizowane w ramach zadania badawczego – *Blokowanie aktywności toksycznej zearalenonu w środkach żywienia zwierząt* (2002) – w ramach Projektu Badawczego Zamawianego – pt. *„Nowe agrochemikalia bezpieczne dla zdrowia i środowiska”* – PBZ-KBN-060/T09/2001/28 wspólnie z naukowcami z Katedry Chemii Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa UWM i Katedry Chemii Organicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Celem detoksykacji było przeprowadzenie takich reakcji biochemicznych, które prowadziłyby do przekształcenia toksycznych związków chemicznych (ZEN) w mniej groźne, które łatwo mogłyby być wydalane z organizmu. Detoksykacja ziarna zbóż skażonego mikotoksynami okazała się bardzo trudna. Opracowana metoda wymagała włączenia do diety określonych związków, które miały za zadanie związać mikotoksyny w przewodzie pokarmowym i/lub zmniejszyć ich biodostępność. Jednym z takich związków okazał się węglan sodu. Właściwe doświadczenie z ZEN zostało poprzedzone badaniem na związkach modelowych, którymi dla ZEN są izokumaryny. Pozwoliło to na prześledzenie kinetyki zasadowej hydrolizy izokumaryn, określenie wpływu temperatury na czasu reakcji i przebieg hydrolizy związków modelowych i w konsekwencji również komercyjnego (krystalicznego) ZEN. Po wyborze destruktora (węglanu sodu) w dalszych badaniach określono warunki pozwalające na przeprowadzenie efektywnej zasadowej hydrolizy ZEN w czasie wytwarzania paszy pełnoporcjowej (etap ekstruzji). Z uwagi na zmianę pH w czasie przebiegających reakcji detoksykacji, opracowaliśmy metodę przywracania paszom wyjściowego pH. Przeprowadzone i udokumentowane badania skuteczności węglanu sodu, jako destruktora ZEN w paszach dla loszek, potwierdziły słuszność założonych hipotez. W badaniach stwierdzono istotną redukcję stężenia ZEN, bez znacznego obniżenia wartości odżywczej badanej paszy podczas ekstruzji paszy skażonej ZEN. Okazało się, że opracowana metoda ma pewne ograniczenia. Nadmiar destruktora wpłynął na ocenę sensoryczną (smakowitość) produktu końcowego, co przejawiło się spadkiem spożycia paszy przez loszki. Ponadto wyższy procentowy udział destruktora w paszy nie powodował większej skuteczności redukcji ZEN. Procedura przywracania wyjściowego pH paszy dodatkiem kwasu cytrynowego, spowodowała otrzymanie paszy lekko zakwaszonej, co w konsekwencji korzystnie wpływało na stan zdrowia zwierząt. Wyniki badań zostały opublikowane w szeregu oryginalnych prac naukowych nr: **B 1.12, B 1.13, B**

1.14, B 1.22, B 1.27, B 1.37, B 1.41), pracy przeglądowej nr: **B 2.30**, na tematycznych konferencjach naukowych nr: **B 2.6, B 2.24** i opracowaniu patentowym (Maciej Gajęcki, Magdalena Polak, Michał K. Łuczyński, Lech Smoczyński, Maciej Góra, **Kazimierz Obremski**, Ewa Skorska-Wyszyńska, Magdalena Gajęcka, Łukasz Zielonka, Ewa Jakimiuk, Marzena Podlipska (2012) Sposób unieszkodliwiania mikotoksyn, zwłaszcza zearalenonu w paszach – Zgłoszenie patentowe (2007.03.09.); Udzielenie patentu 212253, Urząd Patentowy Rzeczpospolitej Polskiej, Warszawa, ogłoszono dnia 7 lutego 2012 roku).

Moje zainteresowanie naukowe wzbudzał udział w prowadzonych w Katedrze badaniach nad wpływem niskich dawek deoksynivalenolu na organizm świń. Badania wykazały, że niskie dawki DON działają immunomodulacyjnie obniżając frakcję gammaglobulin, a zwiększając aktywność lizozymu w surowicy krwi, przy jednoczesnym braku wpływu na ekspresję cytokin prozapalnych w wątrobie (IL-1, IL-6). Podawanie DON w dawce 0,2 i 0,4 mg kg^{-1} wywoływało zwyrodnienie miąższowe i wodniczkowe w wątrobie z większym nasileniem w grupie otrzymującej wyższą dawkę mikotoksyny. Wyniki opublikowano w pracach oryginalnych nr: **B 1.8, B 1.39, B 1.45**, jak i prezentowano na tematycznych konferencjach naukowych nr: **B 2.7, B 2.25, B 2.29.**

Ciekawym był udział w doświadczeniach badających wpływ ZEN na morfometrię układu rozrodczego i produkcję hormonów estrogenowych loszek narażonych na różne dawki i różny czas ekspozycji na ZEN. Analiza parametrów morfometrycznych jajników i macicy niedojrzałych płciowo-loszek otrzymujących niskie dawki ZEN (50% i 100% wartości NOAEL) przez długi okres czasu (48 dni), nie wykazały znaczących zmian w układzie rozrodczym zwierząt eksperymentalnych, za wyjątkiem wzrostu liczby średnich pęcherzyków jajnikowych. Sugeruje to, że ZEN w niskich stężeniach może powodować efekty hormonalne (hyperoestrogenizm), ale nie wykazują aktywności ksenobiotyku. Ponadto w badaniach prowadzonych *in vitro* stwierdzono wpływ ZEN na produkcje i wydzielanie niektórych płciowych hormonów steroidowych przez komórki ziarniste jajnika i osłonki wewnętrznej. Wyniki opublikowano w pracach oryginalnych nr: **B 1.24, B 1.42, B 1.44, B 1.47, B 1.52** jak i prezentowano na tematycznych konferencjach naukowych nr: **B 2.34, B 36, B 2.39, B 2.43, B 2.44, B 2.49.**

Moje zainteresowania naukowe nad wpływem ZEN na zwierzęta nie ograniczają się tylko do ssaków. Znaczący wzrost produkcji ryb hodowlanych w ostatnich dekadach przyczynił się do uznania akwakultury, jako ważnego źródła nowoczesnego zaopatrzenia w światowej produkcji żywności. Powszechne użycie roślinnych dodatków paszowych wzbudziło jednak zaniepokojenie odnośnie możliwych implikacji dla akwakultury,

związanych z występowaniem w paszy dla ryb niepożądanych substancji, w tym mikotoksyn. Pomimo, iż ZEN, mikotoksynę o oddziaływaniu estrogennym, wykrywa się w paszy dla ryb, nie przeprowadzono do tej pory badań, które wskazałyby bezpieczny poziom tego związku dla hodowli ważnych ekonomicznie gatunków ryb. W związku z tym wspólnie z naukowcami z Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska Wydziału Nauk o Środowisku UWM Olsztyn, prowadzę badania nad wpływem oddziaływania ZEN na rozwój i zdrowotność pstrąga. W chwili obecnej wykonuję analizy monitoringowe obecności ZEN w paszy ryb, wodzie pochodzącej ze stawów hodowlanych oraz ikrze pstrąga tęczowego, suma europejskiego, amura i tołpygi białej, pochodzących z polskich oraz norweskich gospodarstw rybackich. Pierwsze wyniki badań zostały opublikowane w publikacji oryginalnej nr: **B 1.57** oraz na tematycznych konferencjach naukowych nr: **B 2.46, B 2.51.** Brak danych, w szczególności odnośnie długotrwałych efektów ekspozycji ryb na niskie dawki mikotoksyn, pozostawia lukę w naszej wiedzy na temat możliwych niepożądanych skutków dla współczesnej akwakultury. Ponadto, dopuszczalna zawartość ZENu w paszy i produktach paszowych dla zwierząt (2 mg kg^{-1} paszy; podana w zaleceniu Komisji Europejskiej z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt), nie została określona na podstawie twardych dowodów dla jakiegokolwiek gatunku ryb. Stwarza to pilną potrzebę zweryfikowania aktualnie obowiązujących limitów. Jest to tematem aktualnie prowadzonych badań w ramach projektu badawczego – *Implikacje dla akwakultury pstrąga tęczowego związane z dopuszczalną zawartością zearalenonu w paszy dla ryb* – NCN UMO-2014/13/D/NZ9/04762, którego jestem wykonawcą.

Z uwagi na naturalną ekspozycję estrogennego ZEN w paszy, wcześniej zajmowałem się badaniem jego roli w układzie rozrodczym zwierząt. W roku 2009 zainteresowałem się wpływem ZEN, jak również toksyny T-2 na układ immunologiczny. W związku z tym, że estrogeny mogą wpływać na komórki efektorowe układu odpornościowego, co jest związane z obecnymi tam receptorami estrogenowymi (ER), podjąłem się badań nad modulacyjnym oddziaływaniem ZEN na GALT. Temat badawczy wydawał mi się interesujący z tego powodu, że tkanka limfatyczna związana z jelitami (GALT) stanowi obronę określonego gospodarza i obejmuje największy zbiór komórek odpornościowych w organizmie. Ponadto GALT jest centralnym punktem układu odpornościowego błony śluzowej z uwagi na miejsca indukcyjne i efektorowe z obszarami i z miejscami, w których dochodzi do różnicowania limfocytów i obrony organizmu w odpowiedzi immunologicznej. Pomysł zaowocował zaproszeniem do współpracy panią prof. dr hab. Annę Winnicką i dr Magdalenę Żmigrodzką

z Zakładu Patofizjologii Zwierząt, Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie oraz dr Piotra Podlasza z Katedry Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM Olsztyn i uzyskaniem projektu badawczy własnego pt: *Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świń* (2009). Uzyskane wyniki stały się podstawą osiągnięcia habilitacyjnego, szerzej opisanego w punkcie 4 oraz zostały opublikowane w pracy oryginalnej nr: **B 1.54** i prezentowane były na tematycznych konferencjach naukowych nr: **B 2.18, B 2.27, B 2.35, B 2.41, B 2.48**.

Pozostałe publikacje wchodzące w skład mojego dorobku, a nie wymienione do tej pory, wymykają się powyższej klasyfikacji. Wszystkie dotyczą jednak wpływu różnych substancji na układ zdrowie i produkcyjność zwierząt.

Wykaz wszystkich moich publikacji naukowych będących wynikiem realizacji powyższych tematów badawczych wraz z pełnym wykazem opublikowanych przeze mnie prac naukowych, dokładnymi informacjami o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy krajowej i zagranicznej oraz o działalności popularyzującej naukę znajdują się w załącznikach nr 3 i nr 4 dołączonych do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Rodzaj publikacji	liczba	IF*	Punkty* MNiSW
Oryginalne prace twórcze (w tym 5 prac wchodzących w skład szczególnego osiągnięcia naukowego)	54	18,076	671,5
Artykuły przeglądowe	10	0,435	29,2
Rozdziały w monografiach	6	-	43
Doniesienia konferencyjne	62	-	-
Łącznie (w tym prace wchodzące w skład szczególnego osiągnięcia naukowego)	132 (5)	18,511 (3,02)	743,7 (100)

* - sumaryczny IF i liczba punktów MNiSW zgodnie z rokiem publikacji.

Prace, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem: **15** prac oryginalnych, **17** doniesień konferencyjnych.

Liczba cytowań:

a) według bazy Web of Science Core Collection: **314**, bez autocytowań **214**
b) według bazy Scopus (Elsevier): **297**, bez autocytowań **226**

Indeks Hirscha:

a) według bazy Web of Science Core Collection: **10**
b) według bazy Scopus (Elsevier): **10**

Kazimierz Jan Obremski